

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

ESTUDOS *IN VITRO* E DE MODELAGEM MOLECULAR *IN SILICO* APLICADOS À INTERAÇÃO ENTRE A ENZIMA DELTA-AMINOLEVULINATO DESIDRATASE E METAIS DO GRUPO 10 (NÍQUEL, PALÁDIO E PLATINA) E 11 (COBRE, PRATA E OURO) DA TABELA PERIÓDICA.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cláudia Vargas Klimaczewski

Santa Maria, RS, Brasil,

2014

**ESTUDOS *IN VITRO* E DE MODELAGEM MOLECULAR *IN SILICO*
APLICADOS À INTERAÇÃO ENTRE A ENZIMA DELTA-
AMINOLEVULINATO DESIDRATASE E METAIS DO GRUPO 10
(NÍQUEL, PALÁDIO E PLATINA) E 11 (COBRE, PRATA E OURO) DA
TABELA PERIÓDICA.**

Cláudia Vargas Klimaczewski

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica Toxicológica

Orientador: Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha
Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Nilda Vargas Barbosa

Santa Maria, RS, Brasil,

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Vargas Klimaczewski, Cláudia
ESTUDOS IN VITRO E DE MODELAGEM MOLECULAR IN SILICO
APLICADOS À INTERAÇÃO ENTRE A ENZIMA DELTA-
AMINOLEVULINATO DESIDRATASE E METAIS DO GRUPO 10
(NÍQUEL, PALÁDIO E PLATINA) E 11 (COBRE, PRATA E OURO)
DA TABELA PERIÓDICA. / Cláudia Vargas Klimaczewski.-2014.
80 p.; 30cm

Orientador: João Batista Teixeira da Rocha
Coorientador: Nilda Vargas Barbosa
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2014

1. Enzima Aminolevulinato Desidratase 2. Metais
Pesados 3. Inibição enzimática 4. Platina, Paládio,
Níquel, Cobre, Prata, Ouro I. Teixeira da Rocha, João
Batista II. Vargas Barbosa, Nilda III. Título.

Universidade Federal de Santa Maria

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

A comissão Examinadora, abaixo assinada,

Aprova a Dissertação de Mestrado

**ESTUDOS *IN VITRO* E DE MODELAGEM MOLECULAR *IN SILICO*
APLICADOS À INTERAÇÃO ENTRE A ENZIMA DELTA -
AMINOLEVULINATO DESIDRATASE E METAIS DO GRUPO 10 (NÍQUEL,
PALÁDIO E PLATINA) E 11 (COBRE, PRATA E OURO) DA TABELA
PERIÓDICA.**

elaborada por

Cláudia Vargas Klimaczewski

Como requisito parcial para obtenção de grau de
Mestre em Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO ORGANIZADORA



Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha
(Presidente/Orientador)



Prof^a. Dr^a. Nilda Barbosa
(Co-orientadora)



Prof^a. Dr^a. Maria Ester Pereira



Prof^a. Dr^a. Simone Pinton

Santa Maria, 5 de Agosto de 2014

Dedico este trabalho aos meus pais Cláudio e Gláucia, que me proporcionaram todo o apoio, amor e incentivo para conquistar este objetivo.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha amada família! Meus pais Cláudio e Gláucia, obrigada de coração por tudo! Jamais esquecerei tudo que sempre fizeram, sem medir esforços, para que eu pudesse conquistar meus objetivos. Obrigada pelo amor, companheirismo, amizade verdadeira e pela confiança que sempre depositaram em mim. Sem vocês nada disso seria possível! Aos meus avós Gilberto e Vilma, exemplos de amor e determinação, obrigada pela ajuda sempre quando necessária, e pelos momentos felizes que passamos juntos! Tenho muita sorte em tê-los na minha vida! À Paolinha, minha tia-mã, muito desta conquista devo a ti, a pessoa com quem compartilhei meus problemas e alegrias do mestrado. Meu sincero agradecimento pela amizade verdadeira, pelos conselhos e apoio em todas as minhas decisões. A meu amado mano Cristiano, meu companheiro pra toda vida, obrigada pelo amor, carinho, amizade! Tenho muito orgulho de ser tua irmã. Minha família, vocês são tudo pra mim, amo muito vocês! Muito obrigada por tudo!

Obrigada Diego Schossler, por colorir a minha vida com o teu amor, tua amizade e companheirismo! Todos os momentos contigo são especiais, sou muito feliz por ter você comigo!

Agradeço ao meu orientador prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha, por ter me dado um voto de confiança e oportunidade de poder fazer parte do seu grupo de pesquisa, por sempre se mostrar disposto a ensinar e acreditar no melhor que podemos ser. São incontáveis as lições importantes que aprendi, devido a maneira com que se preocupa com o crescimento moral e intelectual de seus alunos. Admiro a sua simplicidade, espontaneidade, sinceridade e o amor pela ciência.

À minha co-orientadora Nilda Vargas Barbosa, que foi minha companheira desde os tempos de Uruguaiana, só tenho a agradecer por toda a amizade, pela ajuda sempre que precisei e por todo conhecimento transmitido.

Às professoras Maria Ester Pereira e Simone Pinton pela disponibilidade em avaliar minha dissertação e participar da banca examinadora, mesmo com o tempo corrido.

Aos amigos do laboratório que conheci e convivi ao longo desses quatro anos e meio: Alessandra Vargas, Ana Lima, Angela Figueira, Angélica Ramos, Assis Ecker, Bruna Comparsi, Caroline Wagner, Cintia Corte Real, Cristiane Dalla Corte, Daiane Meinerz, Denis Rosemberg, Diego Souza, Douglas Mariano, Elisângela Colpo, Emily Waczuk, Fabricio Lovato, Fran Brutti, Gabriel Macedo, Gerson Torres, Janisse Viero, Jéssie Sudati, Jean Paul Kamdem, Jeanine Soares, Karen Schott, Komolafe Charles, Leticia Galant, Lilian Lissner, Marcos Braga, Margiane Fortes, Rafael Figuera, Rodrigo Seeger, Romaiiana Pereira, Sandra Pavin, Sílvio Stefanello, Thallita Nascimento, Thiago Lugokenski, Vanise Uberti. Meus queridos colegas, vocês todos são muito importantes, agradeço de coração pelos momentos de descontração, ajuda nos experimentos, conhecimentos transmitidos e pela companhia pra tomar cerveja no barzinho!

Pablo Nogara (Pablito), agradeço especialmente a você por ter contribuído com dados importantes para este trabalho, além de ser um grande colega e amigo!

Obrigada (D)Alessandro Prestes e Matheus(zito) por me presentarem a cada dia com a amizade e companhia de vocês. Tenho muita sorte em tê-los como colegas e amigos!

Robson Puntel e Daniel Roos, agradeço pela atenção quando optei seguir nesta área de pesquisa. Nunca esquecerei da ajuda e conhecimentos transmitidos, muito obrigada!

Obrigada às minhas amigas Marta e tia Elisia pela torcida e pelas orações! Estaremos sempre unidas pelo amor por toda a eternidade! Duas almas predestinadas ao propósito do bem, e que tem uma parcela importantíssima na conclusão de mais esta etapa.

Professora Cristina, professor Gilson e alunos dos seus grupos de pesquisa, queria que vocês soubessem o quanto foram importantes, tanto nos momentos de descontração, quanto nos dias mais difíceis, pois sempre encontrei nos corredores uma palavra amiga, um sorriso, uma ajuda, um reagente que estava faltando...O trabalho fica muito mais prazeroso quando podemos contar com vizinhos tão queridos!

Obrigada Frederico Quadros e Vinicius Oliveira, Cristiane e Caren Mizdal, por me mostrarem o verdadeiro significado da frase "A amizade é um amor que nunca morre". Quero vocês pra sempre junto de mim com essa alegria de viver que contagia!

Gostaria de agradecer especialmente aos meus amigos eternos Bruna Occai, Francielli Araújo Vieira e Rafael Ferreira, com quem passei momentos felizes e de grande aprendizado durante a graduação, mas que vitimados por uma tragédia, tiveram suas vidas interrompidas precocemente. Além da saudade, deixam um exemplo cheio de amor e a certeza que um dia vamos nos encontrar, porque nossa amizade é eterna!

“ É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver”
(Martin Luther King)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
APRESENTAÇÃO.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 A Enzima δ – Aminolevulinato Desidratase - Importância.....	19
3.2. Características Estruturais e Ação Catalítica.....	21
3.3 Aspectos toxicológicos da δ -ALA-D	23
3.4 Metais e δ -ALA-D.....	24
3.5 Considerações sobre os metais dos grupos 10 e 11 da tabela periódica.....	25
3.5.1 Metais do grupo 10.....	25
3.5.1.1 Níquel	26
3.5.1.2 Paládio.....	25
3.5.1.3 Platina	28
3.5.2 Metais do grupo 11	29
3.5.2.1 Cobre	29
3.5.2.2 Prata.....	29
3.5.2.3 Ouro	30
4. MANUSCRITO	33
5. CONCLUSÕES.....	63
6. PERSPECTIVAS:	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ -ALA – ácido 5-aminolevulínico;

δ -ALA-D- Delta- aminolevulinato desidratase

ANOVA – análise de variância

Arg, R – arginina

Asp, D – ácido aspártico, aspartato

Cys, C – cisteína

DTT – ditioneitol

E – energia

GSH- Glutathiona Reduzida

Leu, L – leucina

Lys, K – lisina

NH₂ – grupo amino

NH₃⁺ – grupo amino protonado (carregado positivamente)

NO- nanopartículas de ouro

P – cadeia lateral propiônica

Pb – chumbo

PBG – porfobilinogênio

PBGS – porfobilinogênio sintase

Ser, S – serina

δ – delta

ϵ – épsilon

μ – micro

μ L – microlitro

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

Figura 1. Ilustração esquemática da condensação assimétrica de duas moléculas de ácido 5-aminolevulínico (δ -ALA) para formar porfobilinogênio (PBG).....	19
Figura 2. Rota de biossíntese dos tetrapirrólicos.....	20
Figura 3. Estrutura da conformação cristalina octamérica ativa da δ -ALA-D humana.....	22
Figura 4. Esquema da catálise enzimática da δ -ALA-D.....	23
Figura 5. Esquema demonstrando os grupos da tabela periódica 10, 11, 12 e 13.....	25

MANUSCRITO.

Figure 1A. Effect of Pd(II), Pt(II), Pt(II), and Ni(II), in porphobilinogen synthase from blood.....	54
Figure 1B. Determination of the rate of cysteine and glutathione oxidation caused by Pd(II), Pt(II), Pt(II), and Ni(II).....	56
Figure 1C. Difference Distances between metals (M) Ni (II), Pd (II), Pt (II) and Pt (IV) and Cys- C133, C135, C145.....	58
Figure 2. Comparison of the distances between Zn (II) and Cys from crystal 1H7N (A) and from semi empirical optimization (B).....	57
Figure 3A. Effect of Ag(I), Cu(II) and Au(III) in porphobilinogen synthase from blood....	60
Figure 3B. Determination of the rate of cysteine and glutathione oxidation caused by AgNO ₃ , CuSO ₄ and AuCl ₃	61
Figure 3C. Difference Distances between metals (M) Cu(II), Ag(I), Au(III) and and the Cys- C133, C135, C145.....	62

LISTA DE TABELAS

Table 1. Amino acid residues and water molecules involved in the cluster of δ -ALA-D obtained using the x-ray diffraction of the crystalized enzyme with Zn(II) as a model.....	40
Table 2. Effects of DTT or Zn (II) on PBGS inhibition caused by metal, represent by percentage of activity.....	55
Table 3. Difference Distances between metals (M) and the Cysteines (C) and geometry of each metal tested from 10 and 11 group.....	59

APRESENTAÇÃO

Nos itens **INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, constam uma revisão sucinta da literatura sobre os temas trabalhados nessa dissertação. A metodologia realizada e resultados obtidos que fazem parte dessa dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, que se encontra no item **MANUSCRITO**. No mesmo constam as seções: Materiais e métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas. O item **CONCLUSÕES**, encontrada no final dessa dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais sobre os resultados do manuscrito presente no trabalho. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, DISCUSSÃO e CONCLUSÕES** dessa dissertação.

Dissertação de mestrado

Programa de pós graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

**ESTUDOS *IN VITRO* E DE MODELAGEM MOLECULAR *IN SILICO* APLICADOS
À INTERAÇÃO ENTRE A ENZIMA DELTA-AMINOLEVULINATO
DESIDRATASE E METAIS DO GRUPO 10 (NÍQUEL, PALÁDIO E PLATINA) E 11
(COBRE, PRATA E OURO) DA TABELA PERIÓDICA.**

AUTORA: Cláudia Vargas Klimaczewski

ORIENTADOR: João Batista Teixeira da Rocha

CO-ORIENTADORA: Nilda Vargas Barbosa

LOCAL E DATA DE DEFESA: Santa Maria, 5 de agosto de 2014

A enzima δ -aminolevulinato desidratase humana (δ -ALA-D) é uma metaloenzima que requer grupos tióis reduzidos e o metal Zn(II) para a atividade catalítica máxima, sendo consequentemente um alvo molecular importante para os metais tóxicos ambientais. Sendo assim, este estudo teve como objetivo caracterizar o mecanismo molecular de interação dos sais dos elementos do Grupo 10 níquel (NiCl₂), paládio (PdCl₂), platina (PtCl₂ e PtCl₄) e 11 cobre (CuSO₄), prata (AgNO₃), ouro (AuCl₃) com o sítio ativo da δ -ALA-D, usando métodos *in vitro* (atividade da δ -ALA-D de eritrócitos humanos) e *in silico* (por otimização geométrica com o programa MOPAC2012² - método PM6). Nossos resultados mostraram que Ni(II) e Pd(II) causaram apenas uma pequena inibição (~10%) na atividade da δ -ALA-D de eritrócitos humanos, sendo que esta inibição foi revertida por Zn(II). Pt(II) e Pt(IV) inibiram significativamente a atividade enzimática da δ -ALA-D (75% e 44%, respectivamente) e oxidaram grupos tióis de cisteína e glutatona. A inibição causada na δ -ALA-D por estes metais foi atenuada por Zn (II) e DTT, indicando que à medida que avançamos do elemento mais leve para o elemento mais pesado, a inibição tende a mudar de uma competição por Zn(II) para oxidação de tióis. Já no grupo 11, todos os metais inibiram a enzima δ -ALA-D, e de acordo com dados *in vitro* e *in silico* o mecanismo de inibição parece estar relacionado com a oxidação dos grupos tióis do sítio ativo, enquanto que a incubação com Zn(II) parece bloquear o mecanismo inibitório dos metais do grupo 11 por proteger o sítio ativo da enzima.

Palavras chave: δ -aminolevulinato desidratase, Níquel, Paládio, Platina, Cobre, Prata, Ouro, Sítio ativo, Grupos tióis, Zinco.

Master dissertation
Graduate Course in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

**STUDIES IN VITRO AND MOLECULAR MODELING IN SILICO
APPLIED TO THE INTERACTION BETWEEN ENZYME DELTA-
AMINOLEVULINATE DEHYDRATASE AND METALS GROUP 10
(NICKEL, PALLADIUM AND PLATINUM) AND 11 (COPPER, SILVER
AND GOLD) THE PERIODIC TABLE**

AUTHOR: Cláudia Vargas Klimaczewski

ADVISOR: João Batista Teixeira da Rocha

CO- ADVISOR: Nilda Vargas Barbosa

PLACE AND DATE OF DEFENSE: Santa Maria, August 5th, 2014

Mammalian δ - aminolevulinatase dehydratase (δ -ALA-D) is a metalloenzyme, which requires Zn(II) and reduced thiol groups for maximal catalytic activity, and is an important molecular target for the widespread environmental toxic metals. The mechanism underlying the δ -ALA-D inhibition by elements of Group 10 nickel (NiCl₂), palladium (PdCl₂), platinum (PtCl₂ and PtCl₄) and 11 copper (CuSO₄), silver (AgNO₃), gold (AuCl₃) of periodic table has not yet been determined. The main objective of the present study was to characterize the molecular mechanism of δ -ALA-D inhibition caused by salts of elements of Group 10 and 11 using *in vitro* (δ -ALA-D activity in human erythrocytes) and *in silico* (by geometry optimization with the program MOPAC2012 - PM6 method). Our results showed that Ni(II) and Pd(II) caused only a small inhibition (~ 10%) in the δ -ALA-D enzyme activity, and this inhibition was blunted by Zn(II). Pt forms significantly inhibited the enzymatic activity of δ -ALA-D (75% and 44%, respectively), but this inhibition was attenuated by Zn (II) and DTT, indicating that when moved the element most light to the heavier component, tends to change inhibition in a competition for Zn (II) for the oxidation of thiols. In group 11, all metals inhibited δ -ALA-D, and in accordance with data *in vitro* and *in silico* the mechanism of inhibition seems to be related to the oxidation of thiol groups of the active site, while incubation with Zn (II) appears to block the inhibitory mechanism of the metals of the group 11 for protecting the active enzyme.

Keywords: δ -aminolevulinic acid dehydratase, Nickel, Palladium, Platinum, Copper, Silver, Gold, Active Site, thiol groups, zinc.

1. INTRODUÇÃO

As porfirinas são moléculas essenciais em todas as formas de vida, isto porque estão envolvidas em vários processos biológicos vitais, tais como obtenção de energia, transporte de gases, transferência de elétrons e reações de oxidorredução (MOCHIZUKI et al., 2010). A estrutura molecular das porfirinas consiste em quatro anéis pirrólicos interconectados por ligações metínicas (=CH-) que possui no seu centro um espaço apropriado para acomodar um íon metálico bivalente, que pode ser Fe(II), Mg(II), Co(II) ou Ni(II) (JAFFE, 2003).

A síntese de porfirinas requer a atividade coordenada de mais de dez enzimas diferentes. Uma delas é a delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), também conhecida como porfobilinogênio sintase (EC 4.2.1.24), que catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas do ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA) levando a síntese de porfobilinogênio (PBG), um monopirrol precursor comum na rota biossintética de todos os compostos tetrapirrólicos (NOGUEIRA & ROCHA, 2011).

Uma característica especial da estrutura funcional da δ -ALA-D é a presença de resíduos de cisteína e do íon Zn (II) no sítio ativo da enzima. Os grupos tióis dos resíduos de cisteína estão envolvidos na coordenação do metal Zn (II), assim como Zn (II) está envolvido na estabilização dos grupos tióis, de modo que tem sido proposto que o papel do Zn (II) é prevenir a formação de pontes dissulfeto entre os grupos sulfidrílica da δ -ALA-D (ROCHA et al., 2012). A proximidade entre estes grupos tióis torna a enzima particularmente sensível à oxidação, e a remoção do Zn (II) por agentes quelantes pode acelerar a auto-oxidação da δ -ALA-D (EMANUELLI et al., 1996). Além disso, agentes que oxidam os grupos-SH, como metais que possuam elevada afinidade por grupamentos sulfidrílicos, tais como cobre e mercúrio (TOMOKUNI et al., 1979; ROCHA et al., 1993; EMANUELLI et al., 1996) ou que competem com o local de ligação do Zn (II) no sítio ativo podem inibir a enzima δ -ALA-D, por alterarem a conformação do sítio ativo da enzima. Essa inibição prejudica a rota biossintética das porfirinas, podendo resultar em insuficiente produção de heme, bem como levar a um acúmulo δ -ALA no sangue. Evidências demonstram que o acúmulo de δ -ALA pode ter um efeito pro-oxidante, logo, a inibição da δ -ALA-D acarretaria em superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) (BECHARA et al., 1993).

Neste sentido, estudos com metais pesados tem sido realizados a fim de determinar as propriedades toxicológicas e o modo como interagem com o sítio ativo da δ -ALA-D. O mecanismo de inibição de alguns metais, tais como chumbo (Pb), mercúrio (Hg) e cádmio (Cd) já estão bem estabelecidos. A ação inibitória do chumbo (Pb) está relacionada com a substituição de Zn(II) do sítio ativo da δ -ALA-D por Pb, ao contrário do Hg e Cd em que sabe-se que a inibição deve-se a maior afinidade pelos grupos sulfidrila do que pelo Zn(II), causando uma oxidação direta dos grupos tióis (EMANUELLI et al., 1996; ROCHA et al., 2012; RODRIGUES et al., 1989). Em trabalhos prévios foi demonstrado que, para o grupo 13 (vizinho ao grupo do Zn), o mecanismo inibitório do Al(III), Ga(III), In(III) e Tl(III) muda de uma competição pelo Zn (II) para oxidação de tióis, quando passamos no sentido do Al(III) para o Tl (III) dentro do grupo (ROCHA et al., 2004).

Os metais do grupo 11 cobre (Cu) e prata (Ag) inibem a enzima δ -ALA-D, contudo, ainda não existem estudos detalhados sobre o mecanismo de interação destes metais com o sítio ativo da enzima, bem como a interação do Au(III) com δ -ALA-D (THOMPSON et al., 1977; 1979; TOMOKUNI et al., 1979). O grupo 10 (Níquel, paládio e platina) também não foi estudado a nível de mecanismo de interação com a enzima δ -ALA-D. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo compreender de forma mais detalhada o mecanismo molecular envolvido na interação dos metais do grupo 10 (Níquel, paládio e platina) e do grupo 11 (cobre, ouro e prata) com a δ -ALA-D pela determinação da atividade enzimática e de modelagem molecular *in silico*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o mecanismo molecular envolvido na interação dos metais do grupo 10 (níquel, paládio e platina) e do grupo 11 (cobre, ouro e prata) com a enzima δ -aminolevulinato desidratase de sangue humano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade dos metais estudados em inibir a enzima δ -ALA-D de sangue humano pelo ensaio da atividade da enzima *in vitro*;
- Analisar o possível modo de interação dos metais estudados com a enzima δ -ALA-D humana através de modelagem molecular *in silico*;
- Correlacionar os dados obtidos *in vitro* com os resultados *in silico*, a fim de contribuir com informações essenciais que permitam o entendimento da interação dos metais estudados com a enzima δ -ALA-D.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A Enzima δ – Aminolevulinato Desidratase - Importância

A metaloenzima citoplasmática δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), também conhecida como porfobilinogênio sintase, catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido 5-aminolevulínico (δ -ALA) com perda de 2 moléculas de água, para formar o composto porfobilinogênio (PBG), um monopirrol precursor da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos (Fig. 1).

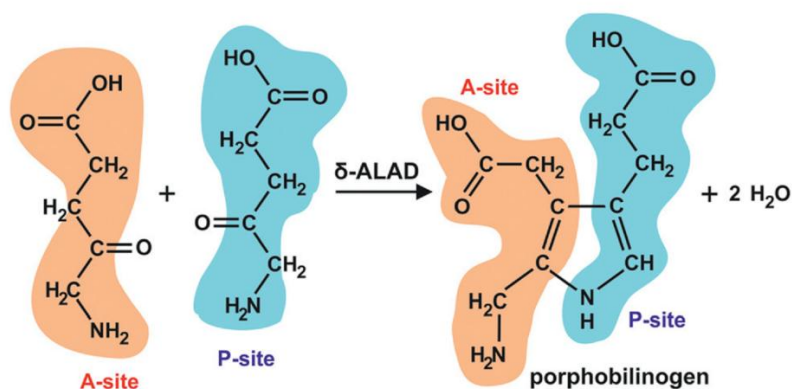


Fig. 1. Ilustração esquemática da condensação assimétrica de duas moléculas de ácido 5-aminolevulínico (δ -ALA) para formar porfobilinogênio (PBG). A molécula δ -ALA vermelho claro torna-se a metade de PBG que contém o radical acetil e o nitrogênio do grupo amino enquanto a molécula δ -ALA (azul claro) torna-se a metade do PBG que contém a porção de propionil e o nitrogênio do pirrol (Fonte da figura: ROCHA et al.,2012).

Além desta catalise enzimática, a biossíntese dos compostos tetrapirrólicos requer a atividade coordenada de mais de dez enzimas diferentes (Fig. 2), sendo a δ -ALA-D a segunda enzima da rota biossintética. Nos animais e fungos, a δ -ALA-D é encontrada no citosol e a fonte do substrato δ -ALA é mitocondrial (sintetizado a partir de glicina e succinil-CoA, via enzima ALA sintase).

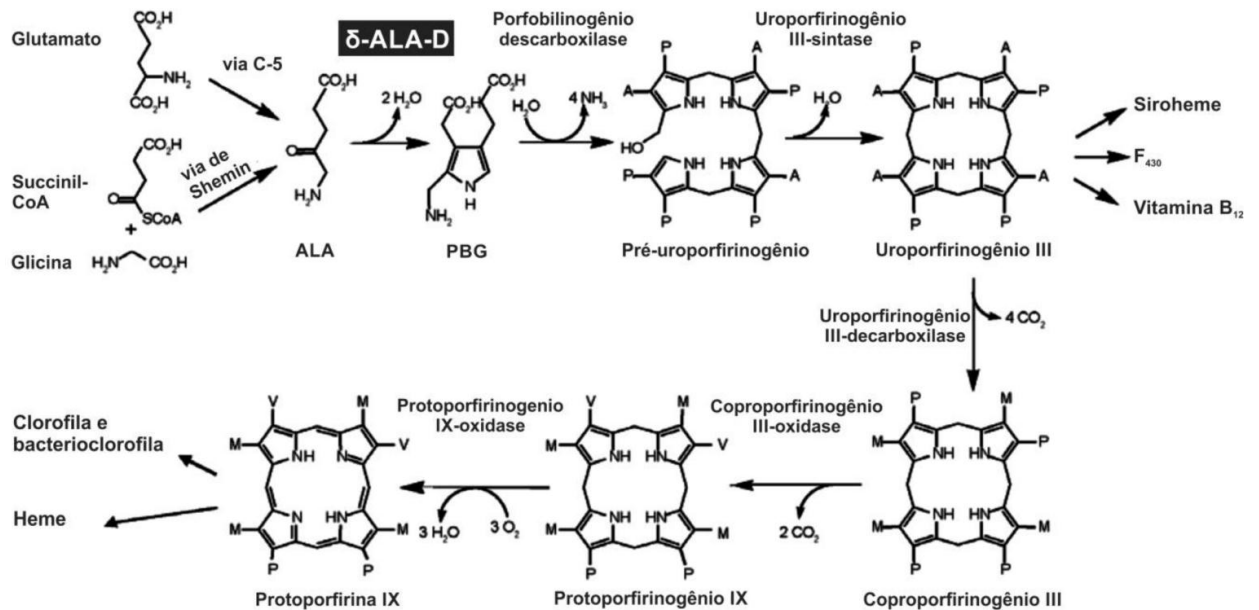


Fig. 2 – Rota de biossíntese dos tetrapirrólicos. **O nome das enzimas envolvidas estão detalhados acima das setas.** FONTE: HEINEMANN et al. (2008).

Os compostos tetrapirrólicos, cuja estrutura molecular consiste em quatro anéis pirrólicos interconectados por ligações metínicas (=CH-), possuem no centro um espaço apropriado para acomodar um íon metálico bivalente, que pode ser Fe(II), Mg(II), Co(II) ou Ni (II) (JAFFE, 2003). Essas moléculas formam uma classe especial de moléculas orgânicas essenciais à execução de vários processos biológicos vitais nos seres vivos (MOCHIZUKI et al., 2010), podendo atuar como coenzimas ou grupos prostéticos de proteínas. Como exemplos mais comuns desta classe de biomoléculas, podemos citar o heme (ferroporfirina), a clorofila (magnésio-porfirina) e a vitamina B12 (cobalto-porfirina). O heme faz parte da estrutura de proteínas que participam do transporte de

oxigênio (hemoglobina e mioglobina), transporte de elétrons (citocromos a, b e c), biotransformação de xenobióticos (citocromo P450) e do sistema de proteção contra peróxidos (catalases e peroxidases) (TIMBRELL, 1991). As clorofilas são pigmentos tetrapirrólicos amplamente distribuídos nos organismos fotossintéticos, são essências no processo de absorção de energia luminosa para a síntese de glicídios e outros produtos orgânicos celulares (NANDI et al., 1968). O anel corrina integra a estrutura da vitamina B12 (cianocobalamina) a qual é sintetizada por algumas espécies de microorganismos. A vitamina B12 na função de coenzima (5'-desoxiadenosilcobalamina e metilcobalamina), participa de reações enzimáticas, tais como a metilação da homocisteína e a conversão do metilmalonil-CoA em succinil CoA.

3.2. Características Estruturais e Ação Catalítica.

Há uma grande semelhança entre a sequência genética da δ -ALA-D isolada de diversas fontes, como a humana, a bacteriana, a animal e a vegetal, sugerindo que essa enzima possui uma estrutura do sítio ativo e atividade catalítica semelhantes em diferentes organismos. A δ -ALA-D proveniente de animais, leveduras e de algumas bactérias possui no sítio ativo o íon Zn (CHEH & NEILANDS, 1973), sendo que este metal está coordenado à grupos -SH para sua ação catalítica. A δ -ALA-D de vegetais é um pouco diferente, uma vez que apresenta íons Mg (ao invés de Zn) no centro ativo coordenados a resíduos de ácido aspártico (ao invés de resíduos de cisteína) (SHIBATA & OCHIAI, 1977, BOESE et al., 1991).

O sítio ativo da δ -ALA-D é composto por resíduos de cisteína, dois átomos de zinco, um resíduo de histidina, um resíduo de lisina e alguns resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. A função do Zn é impedir a formação de pontes dissulfeto entre os grupos sulfidril, uma vez que a manutenção desses grupos no estado reduzido é fundamental para a atividade da enzima (TSUKAMOTO et al., 1979; JAFFE et al., 1995).

Quanto à estrutura, a δ -ALA-D pode existir nas formas octaméricas, que é mais ativa (com peso molecular em torno de 300 kDa) e formas hexaméricas, de baixa atividade.

Configurações diméricas também ocorrem como intermediárias (LAWRENCE et al., 2009). Todas estas espécies estão em condições de equilíbrio, apresentando um sítio ativo por dímero (fig. 3).

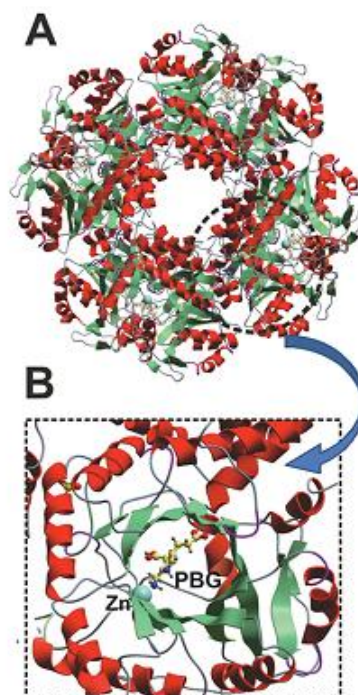


Fig. 3. Estrutura da conformação cristalina octamérica ativa (A) da δ -ALA-D humana. De acordo com a estrutura cristalina, cada dímero de δ -ALA-D apresenta um sítio catalítico (B) contendo o íon bivalente Zn (II) e o produto porfobilinogênio dentro da estrutura sendo formado (Fonte da figura: ROCHA et al., 2012).

Tem sido mostrado que o resíduo lisil do sítio ativo forma uma base de Schiff ($-\text{CH}=\text{N}-$) na interação do grupamento amino com o C4 da primeira molécula de δ -ALA. A união dessa primeira molécula de substrato não requer zinco ou grupamentos sulfidrílicos para ocorrer, e levará a formação da cadeia lateral P (propiónica) da molécula de PBG (JAFFE & HANES, 1986). Em seguida, o nitrogênio do grupo amino da segunda molécula de δ -ALA interage com o Zn(II) que está coordenado aos tiolatos, originando a cadeia lateral A (acética) do PBG. Ao mesmo tempo, o grupamento ϵ -amino de outro resíduo lisil do sítio ativo também forma outra base de Schiff com o C4 desta segunda molécula de δ -ALA

(correspondente à cadeia lateral A). Todas estas interações resultam na condensação assimétrica das duas moléculas, seguida de liberação de água, como mostrado na figura 4. (ERDTMAN et al., 2010).

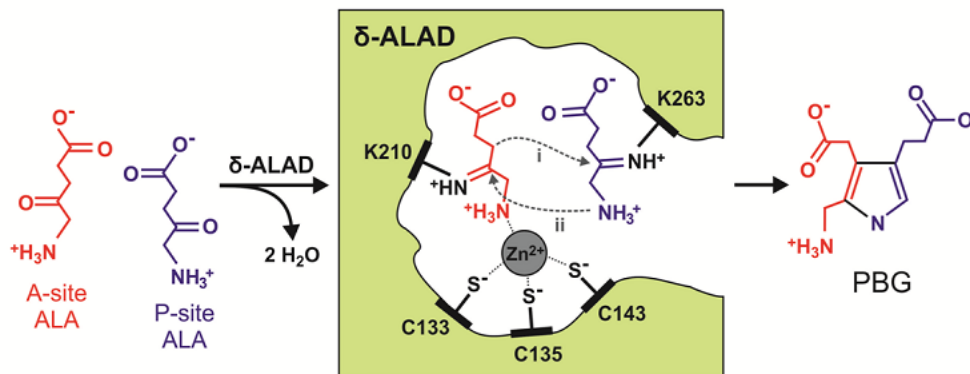


Fig. 4. Esquema da catálise enzimática da δ -ALA-D (baseado em cristais da δ -ALA-D de leveduras, códigos PDB 1H7O e 1OHL), demonstrando a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido aminolevulínico (δ -ALA) para formar o produto Porfobilinogênio (FONTE: ROCHA et al, 2012).

3.3 Aspectos toxicológicos da δ -ALA-D

A inibição da δ -ALA-D pode prejudicar a rota biosintética do heme, levando a uma doença conhecida como porfiria. Além disso, a inibição da δ -ALA-D pode resultar no acúmulo de δ -ALA no sangue, levando à superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) (BECHARA et al., 1993). Assim, tem-se utilizado a δ -ALA-D como um potencial biomarcador de estresse oxidativo em condições patológicas (ERO) (BECHARA et al., 1993). A dosagem da atividade da δ -ALA-D também vem sendo utilizada como um marcador de exposição ao chumbo (ZHAO et al., 2007).

3.4 Metais e δ -ALA-D

A δ -ALA-D é uma enzima sulfidrídica, podendo ser inibida por metais pesados que possuam elevada afinidade por grupamentos sulfidrílicos, como o Pb(II), Cd(II) e o Hg(II) (GIBSON et al., 1955; ROCHA et al., 1995; EMANUELLI et al., 1996). Além disso, alguns metais como o Pb(II) podem inibir a δ -ALA-D por deslocar o Zn(II) do sítio ativo, ao invés de causar oxidação direta dos grupos tióis, isto porque Pb(II) tem um maior raio atômico do que o Zn(II) e que, provavelmente, não pode interagir adequadamente com os resíduos de aminoácidos e o substrato no centro ativo da δ -ALA-D, tal como o faz o Zn(II) (ROCHA et al., 2012). Cd (II) também interage com o sítio ativo da δ -ALA-D, e em contraste com o Pb(II), Cd(II) pode substituir o Zn(II) e manter a catálise da síntese de PBG *in vitro*. No entanto, altas concentrações de Cd(II) inibem a δ -ALA-D e Zn(II) não reativa a enzima. Isso possivelmente indica que em baixas concentrações Cd(II) pode substituir o Zn(II) e participar como ácido de Lewis na catálise enzimática, mas em altas concentrações pode se ligar fortemente e oxidar grupos SH essenciais envolvidos na coordenação com o Zn(II) e importante para a manutenção da estrutura terciária / quaternária nativa de δ -ALA-D (ROCHA et al, 2012). Em trabalhos prévios foi demonstrado que, para o grupo 13 (vizinho ao grupo do Zn), o mecanismo inibitório do Al (III), Ga (III), In, (III) e Tl (III) muda de uma competição pelo Zn (II) para oxidação de tióis, quando passamos no sentido do Al (III) para o Tl (III) dentro do grupo (ROCHA et al., 2004).

Fig. 5.

	1																18
1		2															
1																	
3			3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
4										Ni	Cu	Zn	Al				
5										Pd	Ag	Cd	Ga				
6										Pt	Au	Hg	In				
7													Tl				

Fig. 5. Esquema demonstrando o grupo do Zn (grupo 12), o qual é essencial para que a δ -ALA-D esteja no seu estado nativo (cataliticamente ativa), grupos 10 e 11 (estudados neste trabalho) e o grupo 13 (Rocha et al., 2004). Dados da literatura demonstram que a enzima também pode ser cataliticamente ativa com o Cd (II). Em relação ao grupo 13 foi demonstrado que o efeito inibitório do Al (III), Ga (III), In, (III) e Tl (III) muda de uma competição pelo Zn (II) para oxidação de tióis quando nos movemos do elemento mais leve para o elemento mais pesado (ROCHA et al.,2004).

3.5 Considerações sobre os metais dos grupos 10 e 11 da tabela periódica

3.5.1 Metais do grupo 10

3.5.1.1 Níquel

Níquel (Ni) é um elemento metálico do grupo 10 da tabela periódica que ocorre naturalmente na Crosta terrestre. Devido às suas propriedades físicas e químicas, é muito utilizado na fabricação de ligas para produção de joias, aço inoxidável, baterias Ni-Cd e na niquelagem. Com alta demanda industrial para o níquel, a sua mineração, extração e utilização subiram consideravelmente, resultando em um aumento dos níveis de níquel em ciclos biogeoquímicos e, como resultado, aumento da exposição humana através da contaminação ambiental e exposição ocupacional (RAUCH & PACYNA, 2009). Os níveis deste metal podem variar na água, solo e ar, atingindo aproximadamente de 25 ng/m³ a 170 ng/m³ (LIPPMAN et al., 2006). Como um metal de transição, Ni pode existir em cinco estados de oxidação (-1, 0, 2, 3 e 4) sendo o estado +2 o mais comum no ambiente (GOODMAN et al., 2009).

A inalação é o caminho mais importante de absorção de compostos de níquel, especialmente por trabalhadores envolvidos no processamento deste metal. Exposição por inalação está associada com doenças respiratórias agudas, tais como inflamação, bronquite, asma e edema pulmonar (MAYER et al., 1999). Exposição ao metal Ni também está ligada a doenças renais, cardiovasculares e dermatite alérgica de contato. A carcinogenicidade de Ni é o aspecto mais alarmante da exposição ambiental (MAYER et al., 1999). Além disso, a presença de Ni (II) nas células pode levar ao estresse oxidativo possivelmente via reação de Fenton (mecanismo ainda não conhecido), gerando a produção de radicais hidroxil e peróxido de hidrogênio (OGUNSEITAN et al., 2000). Estes compostos são altamente reativos, podendo interagir com biomoléculas, levando a peroxidação lipídica e danos na membrana. Além disso, Ni pode levar à depleção da atividade de enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GST (JAYASEELAN et al., 2014).

Um estudo realizado com δ -ALA-D de *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa* mostrou que Ni (500 μ M) parece melhorar a atividade da δ -ALA-D destas bactérias, apesar do aumento não ter sido estatisticamente significativo (OGUNSEITAN et al., 2000). Além disso, TOMOKUNI e ICHIBA mostraram que a atividade da δ -ALA-D de eritrócitos não foi inibida pela exposição ao Ni, e essa exposição não produziu alterações na excreção urinária de δ -ALA. CLAUSEN e RASTOGI demonstraram que níveis elevados de

níquel foram encontrados no sangue de mecânicos de oficinas, porém não possuía a atividade da δ -ALA-D alterada.

3.5.1.2 Paládio

Paládio é um dos metais do grupo 10 da tabela periódica, juntamente com níquel e platina. Ele existe em três estados de oxidação: Pd⁰ (metálico), Pd²⁺ e Pd⁴⁺. É encontrado em todos os lugares da crosta terrestre e na água do mar ($\leq 1\text{ng/kg}$) e está entre os mais escassos elementos metálicos (GAD et al., 2014). É um metal utilizado em aparelhos dentários, eletrodomésticos, joias e catalisadores de controle de emissão automotiva. Pela sua extraordinária capacidade de se ligar ao oxigênio, o paládio é também utilizada como catalisador em reações químicas (KIELHORN et al., 2002)

A principal fonte de exposição ao paládio pela população em geral é através do uso de ligas de restauração dentária para coroas e pontes. A quantidade de paládio que é biologicamente disponível sob a forma de íons de paládio depende da corrosão das ligas metálicas odontológicas contendo este metal (MURIS et al., 2012). Vários estudos foram publicados a fim de elucidar a quantidade de liberação deste elemento (medida geralmente por espectroscopia de absorção atômica) obtendo-se um resultado de $0,003\mu\text{g}$ de Pd / cm^2/dia , dependendo das condições do estudo e ligas utilizadas (DRAPAL & POMAJBIK, 1993; SCHULTZ et al., 1997; WATAHA & HANKS, 1996, WATAHA et al., 1999).

Outras vias de exposição também devem ser consideradas, tais como a inalação de paládio liberado por catalisadores de automóveis, a exposição em regiões de mineração ou contato da pele com jóias contendo Pd (MELBER et al., 2002). Trabalhadores de mineradoras, fundição, indústria química, fabricação de catalisadores, indústria eletrônica e joias também são altamente expostos a compostos de Pd(II) em pó ou em solução (KIELHORN et al., 2002).

Uma vez que Pd(II) é absorvido, pode ser encontrado em quase todos os órgãos, tecidos ou fluidos corporais com máxima concentração no rim, fígado, baço (WATAHA & HANKS, 1996). Além disso, os íons de Pd(II) são capazes de se ligar a aminoácidos, proteínas, DNA ou outras macromoléculas (JOHNSON et al., 1976).

Um estudo publicado por HOLBROOK (1975) mostrou que uma curta exposição de roedores ao composto de paládio $[\text{Pd}(\text{NH}_3)_4](\text{HCO}_3)/\text{Kg}$ causou alterações em parâmetros bioquímicos, como a diminuição na atividade de enzimas microsossomais hepáticas. Alterações no peso dos órgãos e anemia também ocorreram. Alterações histopatológicas foram observadas no fígado, nos rins, no baço e na mucosa gástrica de ratos 28 dias após a administração diária por via oral de 15 e 150 mg de $[\text{Pd}(\text{NH}_3)_4](\text{HCO}_3)/\text{Kg}$ de peso corporal (HOLBROOK et al., 1975). Apesar dos estudos toxicológicos abordando o metal paládio, ainda não foi estudado o seu efeito na atividade da δ -ALA-D.

3.5.1.3 Platina

A platina, um elemento do grupo 10 da tabela periódica, se encontra na natureza principalmente nos estados de oxidação Pt(II) e Pt (IV) (Pt (I) e Pt (III) são encontradas com menor frequência (ANTELT, 1999). O metal platina é usado de forma semelhante ao paládio: em catalisadores de automóveis, produção de jóias, eletrônica, ligas de restauração dentária e como catalisadores na indústria química (MELBER et al., 2002). A platina também é utilizada para se produzir a cisplatina, uma importante droga na terapia do câncer (ROSENBERG et al., 1965; HARDEEP et al., 2013). A cisplatina é um fármaco que possui um átomo central de platina no seu estado de oxidação +2, envolto por dois átomos de cloro e dois grupos amônia cis-configurados. Torna-se ativada dentro da célula por substituição dos íons cloreto por moléculas de água e esta forma é muito reativa nos centros nucleofílicos de biomoléculas como DNA, RNA, proteínas e membranas fosfolipídicas, induzindo danos através da apoptose tanto em tumores quanto em tecidos normais (GO, 1999). Tem-se demonstrado por estudos *in vitro* (com sangue humano) e *in vivo* (roedores) que a δ -ALA-D de eritrócitos é inibida por cisplatina. Além disso, este estudo sugere que o mecanismo de inibição da enzima é uma interação direta com os grupos sulfidril, enquanto que o zinco parece envolver apenas com as doses mais elevadas (TREVISAN et al., 2004).

3.5.2 Metais do grupo 11

3.5.2.1 Cobre

O cobre desempenha um papel importante no metabolismo celular, atuando como co-fator em uma série de importantes enzimas, como superóxido dismutase, lisil oxidase e citocromo oxidase. No entanto, ele pode se tornar tóxico em elevadas concentrações (KARAN et al., 1998). Pereira et al (mostrou que o tratamento com Cu 2.6 mg/(kg day) não inibiu a enzima δ -ALA-D na dose testada, e protegeu contra a inibição induzida por Hg. Em contrapartida, um estudo utilizando como modelo o peixe *Leporinus obtusidens* mostrou que a intoxicação com cobre causou inibição da δ -ALA-D, sendo que esta inibição foi relacionada com o aumento do estresse oxidativo observado no teste TBARS (GIODA et al., 2007). Este efeito inibitório da δ -ALA-D por Cu (II) também foi observado para o peixe *Pimelodus maculatus* (RODRIGUES et al., 1989). THOMPSON et al(1979) testou a atividade da δ -ALA-D de eritrócitos humanos na presença de Cu(II), e observou que o íon Cu(II) inibia totalmente a atividade da enzima nas concentrações 23,4 μ mol/L e 39,1 μ mol/L, e a adição simultânea de cobre nas concentrações citadas e Zn (Curva: 0; 200; 400; 600; 800; 1000 μ mol/L) causou maior inibição de δ -ALA-D do que a causada somente por cobre.

3.5.2.2 Prata

Depois de ter sido utilizada como antibiótico desde os tempos antigos e como medicamento tópico no tratamento de queimaduras (KLASEN, 2000; MIRSATTARI et al.,2004) atualmente a prata tem sido importante em muitas outras aplicações devido às suas propriedades antimicrobianas em escala nanométrica, por exemplo, produtos de uso oral, domésticos, vestimentas e materiais cirúrgicos, assim como na fabricação de tintas e cosméticos (MWILU et al., 2013). Os seres humanos também entram em contato com a prata

por soldadura, moedas, louças, jóias, remédios anti-tabagismo, obturações dentárias, suplementos alimentares e ingestão de organismos marinhos (HOLLER et al., 2007; MIRSATTARI et al., 2004).

Devido à presença de nanopartículas de prata (NP) em muitos produtos de consumo, o mecanismo molecular de toxicidade destas nanopartículas vem sendo bastante estudado (SHI et al., 2014; MCSHAN et al.; 2014). A superfície das NP pode ser facilmente oxidada pelo O₂ dos sistemas biológicos, levando à liberação de Ag(I), uma forma mais reativa da prata. Sendo assim, a taxa de oxidação de superfície da nanopartícula está intimamente relacionada com a reatividade da prata com moléculas biológicas, especialmente proteínas contendo grupos tióis e também a interação de nano-prata com ácidos nucleicos, lipídios e proteínas nos sistemas biológicos (REIDY et al, 2013; YU et al, 2013; WIJNHOFEN et al, 2009; JOHNSTON et al, 2010). Além disso, um dos principais mecanismos de toxicidade da Ag(I) é a indução de estresse oxidativo através da geração de espécies reativas de oxigênio que provoca danos aos componentes celulares, incluindo danos no DNA, ativação de enzimas antioxidantes, esgotamento de moléculas antioxidantes (por exemplo, a glutatona), desnaturação de proteínas e danos à membrana celular (AWASTHI et al.,2013; BARUWATI et al.,2013; HAASE et al.,2012; HE et al.,2012). A inibição da δ -ALA-D por prata foi testada em inúmeros trabalhos. (TOMOKUNI et al.,1979; THOMPSON et al, 1977; JOSEPH et al, 1980). Os trabalhos publicados com prata mostram que a inibição ocorre via oxidação dos grupos tióis e o Zn não reverte a atividade enzimática.

3.5.2.3 Ouro

Compostos de ouro têm sido usados desde o início do século XX para tratar a artrite reumatóide, a fim de reduzir o processo inflamatório. Embora recentemente esse tratamento tenha deixado ser utilizado pelos reumatologistas para tratar essa doença, ele ainda é usado como um último recurso. Os mais comumente usados são o tiomalato sódico de ouro e auranofina (JAVED et al.,1987; THOMAS et al., 1987; EISEMAN et al.,1987). A modulação da resposta inflamatória na artrite por compostos de ouro tem sido atribuída à reatividade

destes compostos pelos grupos sulfidríla das enzimas lisossomais (NYARKO, 2004). O efeito do tiomalato sódico de ouro sobre a atividade catalítica das enzimas δ -ALA-D e ferroquelatase (duas enzimas sulfidrílicas) foi testado, mostrando que este composto de ouro inibe as duas enzimas testadas *in vitro*, provavelmente porque interage com os grupos tióis de ambas (JAVED et al., 1987).

Nanopartículas de ouro (NO) vem sendo muito difundidas no tratamento do câncer. Estudos *in vitro* demonstraram que a utilização destas partículas auxilia na localização e na sensibilização das células ao tratamento, como observado no câncer de mama e no tratamento em células de hepatoma de rato (CARDINAL et al., 2008) (LI et al., 2009). Além disso, aumentam a sensibilidade pela radiação nas células de câncer de próstata (ZHANG et al., 2008). Porém, o potencial de toxicidade de nanomateriais é um fator limitante de extrema importância em sua aplicação clínica. Apesar das nanopartículas de ouro serem consideradas classicamente inertes e biocompatíveis, estudos recentes têm questionado a sua segurança, levando em consideração a toxicidade do ouro na faixa de tamanho nano. As NO podem facilmente entrar nas células (CONNOR et al., 2005), ligando-se fortemente a grupamentos amina e grupos tióis de proteínas, permitindo a modificação da superfície de aminoácidos e proteínas (DANI et al, 2008;. SHUKLA et al, 2005). Além disso, foi mostrado que NO podem aumentar o estresse oxidativo, causando depleção de GSH tanto pela interação direta dos grupos tióis, como pela geração de radicais livres induzida pela mesma (XU E HAN, 2004)

3.6 A IMPORTÂNCIA DA MODELAGEM MOLECULAR *IN SILICO* COMO FERRAMENTA NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE MOLÉCULAS

A modelagem molecular *in silico* consiste na aplicação de métodos teóricos utilizados para mimetizar a interação de moléculas, sendo uma importante ferramenta na descoberta e planejamento de novos fármacos, reduzindo o tempo e altos custos envolvidos no desenvolvimento de medicamentos (MAGALHÃES et al., 2007). Além disso, a modelagem molecular pode avaliar mecanismos de interação entre agentes tóxicos e

alvos importantes, levando em consideração as propriedades eletrônicas e estruturais para um perfeito encaixe no sítio receptor (KITCHEN et al., 2004).

Existem dois tipos de métodos teóricos utilizados para desenvolver estudos de modelagem molecular: os baseados em mecânica clássica e os baseados em mecânica quântica (MAGALHÃES et al., 2007). Na mecânica clássica, a molécula é uma série de esferas carregadas (os átomos) conectadas por bastões (as ligações), sem considerar a posição dos elétrons, sendo que este método é útil para calcular as energias resultantes do alongamento das ligações, ângulo de flexão e interações não ligadas (KITCHEN et al., 2004).

Já a mecânica quântica considera as interações entre os elétrons e o núcleo de cada átomo, ou seja, diferentemente da mecânica molecular, neste caso os átomos não são tratados como esferas sólidas. A mecânica quântica pode ser explicada com a aplicação da equação de Schrödinger (equação 1):

$$H\Psi=E\Psi \quad (1)$$

onde, o operador hamiltoniano (H) descreve as energias entre elétrons e núcleo levando em consideração a posição espacial de cada partícula; o Ψ é a função de onda, que é uma função da posição da partícula e do tempo, e o E é a energia total do sistema (ALMEIDA & SANTOS, 2001). Os cálculos envolvendo métodos clássicos são mais rápidos, porém com uma menor acurácia quando comparado com os cálculos quânticos, que tem maior acurácia e são mais lentos do ponto de vista computacional (KITCHEN, 2004).

4. MANUSCRITO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no manuscrito, o qual está disposto na forma em que será submetido para publicação.

Estudos *in vitro* e de modelagem molecular *in silico* aplicados à interação entre a enzima delta-aminolevulinato desidratase e metais do grupo 10 (níquel, paládio e platina) e 11 (cobre, prata e ouro) da tabela periódica.

Manuscrito

Studies *in vitro* and molecular modeling *in silico* applied to the interaction between enzyme Delta-Aminolevulinate Dehydratase and metals group 10 (nickel, palladium and platinum) and 11 (copper, silver and gold) from the periodic table.

Claudia Vargas Klimaczewski, Pablo Nogara, Nilda de Vargas Barbosa, João Batista Teixeira da Rocha.

Interaction of group 10 (Ni(II), Pd(II) e Pt(II)) and 11 (Cu(II), Ag(I) e Au(III)) with human blood ALA-D: An *in vitro* and *in silico* studies.

Cláudia Vargas Klimaczewski^a, Pablo Nogara^b, Jean Paul Kamdem^a, Nilda de Vargas Barbosa, João Batista Teixeira da Rocha^a.

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology and Program of Post-Graduation in Biological Sciences-Biochemical Toxicology, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^b Department of Organic Chemistry, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

Corresponding Author

Dr. João Batista Teixeira da Rocha

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Programa de Pós graduação em Bioquímica Toxicológica

97.115-900, Santa Maria, RS, Brasil

Abstract. Mammalian δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) is a metalloenzyme, which requires Zn(II) and reduced thiol groups for maximal catalytic activity, and is an important molecular target for the widespread environmental toxic metals. The mechanism underlying the δ -ALA-D inhibition by elements of Group 10 nickel (NiCl_2), palladium (PdCl_2), platinum (PtCl_2 and PtCl_4) and Group 11 copper (CuSO_4), silver (AgNO_3), and gold (AuCl_3) of periodic table has not yet been determined. The main objective of the present study was to characterize the molecular mechanism of δ -ALA-D inhibition caused by salts of elements of Group 10 and 11 using *in vitro* (δ -ALA-D activity in human erythrocytes) and *in silico* (by geometry optimization with the program MOPAC2012.2 - PM6 method). Our results showed that Ni(II) and Pd(II) caused only a small inhibition (~ 10%) in the δ -ALA-D enzyme activity, and this inhibition was blunted by Zn(II). Pt forms significantly inhibited the enzymatic activity of δ -ALA-D (75% and 44%, respectively), but this inhibition was attenuated by Zn (II) and DTT, indicating that when moved the element most light to the heavier component, tends to change inhibition in a competition for Zn (II) for the oxidation of thiols. In group 11, all metals inhibited δ -ALA-D, and in accordance with data *in vitro* and *in silico* the mechanism of inhibition seems to be related to the oxidation of thiol groups of the active site, while incubation with Zn (II) appears to block the inhibitory mechanism of the metals of the group 11 for protecting the active enzyme.

Keywords: δ -aminolevulinic acid dehydratase, Nickel, Palladium, Platinum, Copper, Silver, Gold, Active Site, thiol groups, zinc enzyme.

1. Introduction

δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D, E.C. 4.2.1.24) plays a fundamental role in aerobic organisms by participating in the heme biosynthesis (SASSA et al., 1989). This thiol-containing enzyme catalyzes the asymmetric condensation of two molecules of δ -aminolevulinic acid (δ -ALA), leading to the synthesis of porphobilinogen (PBG). PBG is a common monopyrrole precursor of all tetrapyrrolic compounds found in the prosthetic heme group of different proteins (NOGUEIRA & ROCHA, 2011; JAFFE et al., 2003).

A special feature of the functional structure of δ -ALA-D is the presence of cysteine residues and zinc ion [Zn (II)] in the active site of the enzyme. The thiol groups of cysteine residues are involved in the coordination of Zn (II), and this metal stabilizes the thiol groups. Therefore, it has been proposed that the role of Zn (II) is to prevent the formation of disulfide bridges between the sulfhydryl groups of δ -ALA-D (ROCHA et al., 2012), in addition to participating as Lewis acid in the catalysis.

The proximity of the thiol groups in the active site renders the enzyme very sensitive to oxidation, and the removal of the Zn (II) by chelating agents can accelerate autoxidation of δ -ALA-D (EMANUELLI et al., 1996). Consequently, metals that have high affinity for sulfhydryl groups, for instance, Pb(II) and Hg(II) can compete with the binding site of Zn (II) in the active site and inhibit δ -ALA-D activity by altering the conformation of the active site of the enzyme (TOMOKUNI et al., 1979; ROCHA et al., 1993; EMANUELLI et al., 1996). This inhibition can impair the biosynthetic pathway of porphyrins and may result in the accumulation of δ -ALA in blood, promoting oxidative stress by overproduction of reactive oxygen species (ROS) (BECHARA et al., 1993; ROCHA et al., 2012).

The mechanism by which Pb(II), Hg(II) and Cd(II) inhibit δ -ALA-D activity has been well established. For instance, the inhibitory action of Pb (II) is related to the substitution of Zn (II) from active site of δ -ALA-D by Pb (II). On the other hand, Hg (II) and Cd(II) inhibit the enzyme via interaction and oxidation of sulfhydryl groups of the enzyme (RODRIGUES et al., 1989; EMANUELLI et al., 1996; ROCHA et al., 2012).

Previous studies from our research group has shown that metals from the group 13 (Al (III), Ga (III), In (III) and Tl (III)), which neighbor the group 12 (i.e., the Zn group) in the periodic table inhibit δ -ALA-D with different potencies and mechanisms (ROCHA et al.

2004). Indeed, Al(III) and Ga(III) competed with Zn(II), whereas In(III) competed with Zn(II) and oxidized thiol groups of the enzyme. Tl(III) inhibited ALA-D by oxidizing the thiol groups of the mammalian enzyme. Although metals from group 11 [Cu(II) and Ag(I)] have been reported to inhibit δ -ALA-D, there are still no detailed data about the interaction mechanisms of these metals with the active site of the enzyme (TOMOKUNI et al., 1977; 1979). In addition, details about the interaction of Au(III) with δ -ALA-D has not been found in the literature. Similarly, there is a lack of information regarding the action of metals from group 10 Ni (II), Pd (II) and Pt (II) and (IV) with mammalian δ -ALA-D.

Considering that the interaction of metals with δ -ALA-D can modify its structure and, consequently, its biological functions and that there is no detailed studies about the interaction of δ -ALA-D and metals from group 10 (Ni(II), Pd(II) and Pt(II and IV)) and Group 11 (Cu(II), Au(III), Ag(I)) of the periodic table, the present study was undertaken to better understand the biochemical interaction of these metals with human blood δ -ALA-D. The *in vitro* effects of these metals and their interaction with the active site of the enzyme were also evaluated by using *in silico* molecular modeling methods.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals.

DL-Dithiothreitol (DTT), δ -aminolevulinic acid hydrochloride (δ -ALA), p-dimethylaminobenzaldehyde, zinc chloride (ZnCl₂), silver chloride (AgCl₂), copper sulfate (CuSO₄), platinum chloride (PtCl₂, PtCl₄), gold chloride (AuCl₃), Palladium chloride (PdCl₂) and MES buffer (2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid hydrate) were obtained from Sigma Co. (St. Louis, MO, USA). Nickel chloride (NiCl₂), was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All other reagents were commercial products of the highest purity grade available.

2.2. Samples

Venous blood was drawn from healthy human volunteers, the Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. The blood was collected into heparinized tubes and centrifuged at 1,000 rpm for 10 min. The supernatant was discarded and the pellet containing the erythrocytes was diluted 1:1 with distilled water. Erythrocytes were further hemolysed by adding Triton X-100 (final concentration 0.2μ%). The blood was used immediately after hemolysis. The protocol was approved by the ethical committee from UFSM (076/2012(2)).

2.3. Enzyme assay

δ-ALA-D activity was assayed according to the method of SASSA (1982). The principle of the method consists in determining the amount of product porphobilinogen, formed after incubation of the enzyme with excess of substrate (δ-aminolevulinic acid, ALA). The incubation medium contained MES buffer (250 mM, pH 6.8) and 20 μL of erythrocytes (total volume of 45 μL). This mixture was pre-incubated for 10 min at 37°C in the presence of different concentrations of the metal, Zn(II), DTT or Zn(II)+DTT (as indicated in the table 2). The reaction was started by adding 10 μL of δ-ALA (to a final concentration of 2.5 mM). After 1 hour, the porphobilinogen was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm.

3.4 Determination of cysteine and glutathione oxidation

The rate of cysteine and glutathione oxidation was determined according CHINARD and HELLERMAN (1954). Initially, 0,15mL of potassium phosphate buffer (pH 6.8) containing cysteine 2 mM or glutathione 2mM and different concentrations of metals (shown in the figures) were added to a saturated solution of (NH₄)₂SO₄ containing 7.1 mM KCN (total

volume 2.1 mL). In this mixture was added 200 μL of concentrated NH_4OH . Immediately was reading in spectrophotometer to 546nm.

2.5 *In Silico* Studies

For the *in silico* studies, the active site models (clusters) of δ -ALA-D with 5 \AA resolution were constructed using the original Zn(II) crystalized with the δ -ALA-D structure (obtained in the protein data banking with the entry PDB: 1H7N) with the aid of program Avogadro 1.1.1 (STEWART et al, 2012). Table 1 depicts the amino acid residues and water molecules included in the clusters generated at the 5 \AA resolution (Table 1).

Table 1: Amino acid residues and water molecules involved in the cluster of δ -ALA-D and Zn(II) obtained using the x-ray diffraction of the crystalized enzyme with Zn(II) as a model. The residues and water numbers were according the sequence of δ -ALA-D enzyme from 1H7N structure.

Size of cluster	5\AA
Residues	Cys ⁻ 133, Cys ⁻ 135, Cys ⁻ 143, Leu134, Ser179, Asp180, Arg ⁺ 232
water	HOH2232, HOH2259, HOH2287, HOH2297, HOH2382

Here we consider that occur the replacement of the Zn(II) in the active site of the enzyme by the metal under investigation. Thus, each cluster was optimized with different metals (M), initially placed in the same location of Zn (II) [M= Zn(II), Cu(II), Ag(I), Au(III), Ni(II), Pd(II), Pt(II) and Pt(IV)]. To simplify the calculation, only the lateral chain of Cys and the α -carbon were frozen (because the back bone of proteins were considered rigid). The clusters were optimized with the program MOPAC2012 (using PM6 method). The structures

were visualized by the software Discovery Studio Visualizer 3.5.0. HANWELL et al., 2012, STEWART et al., 2007; 2012).

2.6 Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's Multiple Comparison Test. Results were considered statistically different when $p < 0.05$.

3. Results:

3.1 Results from 10 group

3.1.1 Erythrocyte human δ -ALA-D inhibition by metals of group 10

From group 10, Pt (II) was the most potent inhibitor of δ -ALA-D (IC₅₀ 19, 9 μ M). Indeed, Pt(II) caused an almost complete inhibition of δ -ALA-D at 50 μ M. PtCl₄ also inhibited δ -ALA-D, however, its inhibitory potency was lower than that caused by Pt (II) (IC₅₀ 86,15 μ M). As depicted in figure 1A, in contrast to Pt(II), Ni(II) and Pd(II) caused only modest inhibition of δ -ALA-D (about 15%) at high concentrations of the metals (IC₅₀>200 μ M for both metals) (Fig. 1A).

3.1.2 Potential antagonism of δ -ALA-D inhibition by Zn and DTT

To determine the potential mechanism of δ -ALA-D inhibition by metals of group 10, we determined whether or not Zn(II), DTT and their combination could blunt the inhibitory effect of the metals tested. Zn+DTT without metal did not change significantly the erythrocyte δ -ALA-D. The small inhibitory effect of Ni(II) was blunted by Zn(II) and

Zn+DTT. DTT alone did not change the effect of Ni(II). The small inhibitory effect of Pd(II) was not modified by Zn(II), DTT or Zn+DTT. The marked inhibitory effect of Pt(II) was considerably decreased by Zn(II). DTT also blunted the inhibitory effect of Pt(II), but with a smaller potency than Zn(II). Simultaneous addition of DTT and Zn(II) restored the enzyme activity to levels close to those of control values. The inhibition of δ -ALA-D by Pt(IV) was decreased by Zn(II) and DTT and in the presence of DTT plus Zn(II) the enzyme activity was similar to that observed in the absence of inhibitor (Table 2).

3.1.3 Oxidation of cysteine and glutathione by metals of group 10

The potential involvement of cysteinyl residues oxidation on δ -ALA-D inhibition by Ni (II), Pd (II), Pt (II) and Pt (IV) was also examined by testing the rate of cysteine and GSH oxidation (fig. 1B). Ni (II) and Pd (II) promoted a modest oxidation of cysteine (fig 1B). In contrast, 50 μ M of Pt (II) and 100 μ M of Pt (IV) increased considerably cysteine oxidation and similar results were observed with GSH. Taken together, these results suggest that Ni (II) and Pd (II) had low capacity to oxidize cysteine and GSH (fig 1B), whereas Pt (II) and Pt (IV) caused significant oxidation of cysteine and GSH.

3.1.4 *In silico* results

The program MOPAC2012² (PM6 method) was used for the *in silico* determinations. The program estimates the interaction between metals and cysteine residues using semiempirical calculations.

Zinc was the first metal used to validate the calculation method, because we could compare the simulation of its computational interaction with the enzyme with its real interaction in the crystalized enzyme. Figure 2A depicts the interaction of Zn with cysteine C133, C135 and C143 estimated by the *in silico* approach. A comparison with the crystallographic data indicated a very strong similarity between the *in silico* calculation and

the crystallographic results. In both cases, Zn coordinates with tetrahedral geometry with cysteinyl residues. Importantly, the distances between Zn (II) and cysteinyl residues were almost coincident between the crystal and *in silico* data (Fig. 2A and Fig. 2B; Table 3).

3.1.5 *In silico* results for 10 group elements

The semi empirical calculations of Ni(II) interaction with δ -ALA-D cysteinyl residues indicated that Ni (II) can coordinate with cys 133, cys 135 and cys143 (fig 1D and 1E). In fact Ni(II) coordination bond distances were almost identical to those observed with Zn(II) in δ -ALA-D crystal or in the *in silico* model. However, the geometry of Ni (II) coordination with cysteinyl residues had square pyramidal distorted type interaction (Table 3).

Pd (II) interacted with ala-d in a similar way to Ni (i.e.; with a square distorted pyramidal geometry). However, the distances of Pd (II) to cysteinyl residues were higher than those observed with Zn (II) (fig 1D and 1E; Table 3).

The distances of Pt (II) to cysteinyl residues of δ -ALA-D were very similar to those obtained for Pd (II); however, the interaction of Pt (II) with cysteinyl residues was of square planar geometry (fig 1D and 1E). In contrast, the interaction of Pt(IV) with δ -ALA-D cysteinyl residues had a square pyramidal geometry. The distances of cys 133 and 135 to Pt(IV) were almost similar to that of Pt(II); however the distance of cys143 to Pt(IV) was shorter than that calculated for Zn (II) and Pt(II) (fig 1D and 1E).

4.1 Results from 11 group

4.1.1 Erythrocyte human δ -ALA-D inhibition by metals of group 11

Cu (II), Ag (I) and Au (III) inhibited erythrocyte δ -ALA-D with a greater potency than did metals of group 10 (compare fig. 1A with fig. 3A). Within the group 11, the inhibitory

effect of metals was similar, though Ag(I) tended to have a stronger inhibitory potency than Cu(II) and Au(II) (Fig. 3A).

4.1.2 Potential antagonism of δ -ALA-D inhibition by Zn(II) and DTT

The inhibition of δ -ALA-D by Cu (II) was markedly restored in the presence of DTT (800 μ M). Moreover, ZnCl₂ blunted partially the inhibition caused by Cu(II). Whereas in the presence of Zn plus DTT the enzyme activity was even higher than that observed in the absence of Cu(II). The inhibitory effect of Ag(I) was considerably decreased in the presence of the Zn(II). DTT and DTT+ Zn completely blunted the inhibitory effect of Ag(I). The inhibitory effect of Au(III) was reduced in the presence of Zn (II) in the incubation medium. DTT also partially restored δ -ALA-D activity and DTT+ Zn completely restored the enzyme activity to control levels (Table 2).

4.1.3 Oxidation of cysteine by metals of group 11

Potential involvement of cysteinyl groups oxidation in the inhibitory effects of Cu (II), Ag (I) and Au (III) was examined by testing the rate of cysteine (fig. 2D) and GSH oxidation (fig. 2E). Cu (II) and Ag (I) considerably stimulated cysteine and GSH oxidation. Au (III) caused only a modest oxidation of cysteine and GSH when compared with Cu (II) and Ag (I) (fig 3B and 3C).

4.1.4 *In silico* results for 11 group

The semi empirical calculations for Cu(II) interaction with δ -ALA-D cysteinyl residues of active δ -ALA-D indicated that distances of cys 135 and 143 to Cu(II) were higher than that calculated for Zn (II), however the distance of cys143 to Cu(II) was shorter in

comparison for Zn (II) (Fig 3D and 3E). The geometry of Cu (II) coordination with cysteinyl residues was of tetrahedron type (table 3).

The distances of Ag (I) to cysteine residues were markedly higher than those observed with Zn (II) and other metal from same group, suggesting that this metal has a low affinity for thiol groups (Fig 3D and 3E). The interaction of Ag(I) with cysteinyl residues did not fit a plausible geometry (table 3).

The distances of Au (II) to cysteine residues were higher than those observed with Zn (II) for all cysteine residues, forming a square distorted pyramidal geometry (table 3).

4. Discussion

This study aimed to understand in more detail the molecular mechanism(s) involved in the interaction of the group 10 (nickel, palladium and platinum) and group 11 metals (copper, gold and silver) with the enzyme δ -aminolevulinate dehydratase from human blood.

Ni (II), similar to Pd (II), did not inhibit efficiently δ -ALA-D enzyme (the maximal inhibitory effects of these metal were approximately 10%). Our results are compatible with a study published by TOMOKUNI and ICHIBA (1990), who have indicated that erythrocyte δ -ALA-D activity from rat was not inhibited after exposure to Ni (II). Similarly, CLAUSEN and RASTOGI (1977) showed that occupational exposure to high levels of nickel were not associated with blood δ -ALA-D inhibition. The *in silico* results indicated that both Ni(II) and Pd(II) interacted with the active site of the enzyme with similar distances of those observed for Zn(II). However, the adopted geometry was different from that of Zn(II). The experimental results of cysteine and GSH oxidation indicated that these two metals did not oxidized the thiol groups significantly. Consequently, it can postulated that even if these metals could displace Zn(II) from the active site (which could not be evaluated here), they are not expected to oxidize the thiol groups of δ -ALA-D. Since δ -ALA-D can also be catalytically active with Cd(II), we cannot rule out that the enzyme can be active with these two metals.

In contrast to Ni(II) and Pd(II), Pt(II) and Pt(IV) inhibited δ -ALA-D with good potencies. The *in silico* results indicated that the two ionic forms of Pt(II) adopted geometries

distinct of that of native Zn(II); however, both Pt(II) and Pt(IV) fitted well to the active site of the enzyme. The *in vitro* experimental data indicated that both Pt(II) and Pt(IV) stimulated the oxidation of cysteine and GSH, which suggest that they can compete with Zn(II) and oxidize the thiol groups of the active site of the human δ -ALA-D.

Previous studies have shown that erythrocyte δ -ALA-D from human blood can be inhibited by cisplatin *in vivo* and *in vitro*. Furthermore, it was suggested that the mechanism of enzyme inhibition is related to a direct interaction of cisplatin with sulfhydryl groups of δ -ALA-D (TREVISAN et al.,2004). The results presented here indicated that δ -ALA-D inhibition by PtCl₂ was mainly restored by high concentrations of Zn and only partially by DTT. Taken together, the inhibitory effect of Pt(II) seem to involve more a competition with Zn(II) than oxidation of the thiol groups of the enzyme. In addition, Pt(II) tends to acquire a geometry square planar characteristic of soft acid, which could allow the formation of strong bonds with sulfur-containing ligands in the active site (fig.2). In contrast, Pt (IV) had a low inhibition capacity (\cong 40%) when compared with Pt(II) (67%). This small effect can be explained by the size of the ionic radius. The Pt(IV) has an radius smaller than that of Pt(II), becoming a harder metal than the Pt(II). Consequently the interaction with soft thiolate groups from the active site is less favored. In contrast to Pt(II), which has it inhibitory effects antagonized more efficiently by Zn(II) than DTT, the inhibitory effect of Pt(IV) was similarly blunted by Zn(II) or DTT. Taken together, the inhibition of δ -ALA-D by Pt(II) and Pt(IV) involves both a competition with Zn(II) and thiol oxidation; however, the thiol oxidation efficacy of Pt(II) was higher than that of Pt(IV).

Cu(II) inhibited the activity of δ -ALA-D enzyme from human erythrocytes with a good potency. Accordingly, the inhibition of δ -ALA-D by Cu(II) has already been reported in the literature (RODRIGUES et al., 1989; THOMPSON et al.,1979). The inhibition of δ -ALA-D observed here was blunted by Zn(II) and DTT, indicating both a competition between Cu(II) and Zn(II) and oxidation of the cysteinyl residues of the active site of the enzyme by the metal. The *in silico* results indicated that Cu(II) fitted well with the Zn(II) binding site in the active site. However, *in silico* data showed that Cu(II) had a lower distances between C133 and C135 cysteine residues, when compared Zn(II). Furthermore, the distance between C143 and C135 cysteine residues were shorter than in the native enzyme (data not shown). Moreover, the distance between Cu(II) and C143 residue was shorter than the value found for

Zn(II) (Zn C143 = 2.26, C143 Cu = 1.34). Taken together with the *in vitro* oxidation of cysteine and GSH, the results indicated that Cu(II) was a potent oxidizer of thiol groups. Thus, Cu(II) can enter in the active site of the enzyme and interact with the thiol groups, oxidizing them. Thus, the total reversal of the activity of the enzyme by DTT and Zn(II) can be mainly by the action of DTT, maintaining the thiolates in a reduced state. In fact, Cu (II) can oxidize thiol groups of biomolecules according to the following reaction:



REACTION 1: Effect of Cu (II) in the thiol groups from biological systems (SMITH et al., 1994).

Ag(I) proved to be a strong inhibitor of erythrocyte δ -ALA-D. Like Cu(II), Ag(I), also oxidized cysteine (69.5%) and GSH (83.0%) significantly. So we can assume that this is the mechanism by which Ag(I) inhibited the enzyme. In accordance, incubation of erythrocytes with DTT recovered in 97% enzyme activity inhibited by Ag(I), confirming the hypothesis that inhibition by oxidation of thiols. *In silico* data showed that silver peculiarly reacts with the cysteine residues, because the distance that the metal and C133, C135 and C145 were extremely higher when compared to Zn. Thus, Ag(I) possibly oxidized thiol groups and it was expelled from the active site because of energy constraints. Similar to Cu(II), Zn(II) incubation also protected the enzyme against inhibition caused by Ag(I). Thus Zn(II) probably by hindering Ag(I) interacts with the active site of the enzyme. Thus, the total protection of the activity of the enzyme with DTT and Zn is mainly due to the protection by DTT of thiolates from oxidation by Ag (I). In accordance with literature, the inhibition of δ -ALA-D by Ag (I) was previously reported (TOMOKUNI et al, 1979;. Thompson et al, 1977; JOSEPH et al, 1980).

Similarly to Cu(II) and Ag(I), Au(III) (50uM) completely inhibit enzymatic catalysis of erythrocyte δ -ALA-D. The oxidation of thiol groups of cysteine and GSH (22.5% and 44%, respectively) was lower compared to the oxidation caused by Cu(II) and Ag (I). The inhibitory effect of Au (III) was blunted by Zn(II) and by DTT. The *in silico* results indicated that Au (III) can interact with the same cysteinyl residues than Zn(II). Thus, we can speculate that Au (III) can not oxidize thiol groups because Zn(II) hindered the interaction of Au (III) with critical thiol groups of the enzyme. There are only few data about oxidation of thiol

groups by Au(III). DANI (2008) and SHUKLA (2005) demonstrated that gold nanoparticles can readily enter cells and bounded strongly to thiol and amine groups of proteins.

5. Conclusion

The interactions of the metals of groups 10 and 11 of the periodic table with the active site of the enzyme δ -ALA-D were not similar. In previous work we demonstrated that for the group 13, the inhibitory mechanism of Al(III), Ga(III), In(III) and Tl(III) changed from a competition with Zn(II) to oxidation of critical thiol groups of the enzyme, when we moved from Al(III) to Tl(III) within the group 13. In the present study, we observed a somewhat phenomenon in group 10. Ni and Pd caused a only modest inhibition of the enzyme, that was blunted by Zn. The inhibitory Pt(II) and Pt(IV) was blunted by Zn and DTT, indicating that as we move from the lightest to the heaviest element, competition the inhibition tended to change from a competition by zn to oxidation of thiols. However, the inhibition caused by Pt(II) and Pt(IV) was blunted by Zn (II) and DTT.

In group 11, all metals inhibited δ -ALA-D, and both DTT and Zn protect from the enzyme. Although *in silico* data have indicated that all metals (except silver) coordinated a similar pattern to Zn (II) (but with a different geometry) we can not know the capacity of these metals to displace Zn on the active center of the enzyme. In other words, these metals could theoretically only approximate and oxidize thiol groups (as for Pt (II), Pt (IV), Cu (II) and Au (III)). In the case of Ag (II), it perhaps oxidize thiols located on the site A of the enzyme. However, the results presented in Table 2 show that for most of the elements there is a competition between the Zn (II), and metals, but the oxidation of thiols appears to be more important than competition for Zn (II). In summary, more detailed studies using δ -ALA-D purified enzyme and removing Zn (II) by chelation are needed to understand the interaction of these metals with the active site.

7. References

ANDERSON, S.; SASSA, D.F.; BISHOP, R.; DESNICK, C.R.; SCRIVER, A.L.; BEAUDET, W.S.; SLY, D. V *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*, v.8, p. 2991–3062, 2001.

BECHARA, E. J. M.; MEDEIROS, M. H. G.; MONTEIRO, H. P.; HERMES-LIMA, M.; PEREIRA, B.; DEMASI, M.; COSTA, A. A.; ADBALLA, D. S. P.; ONUKI, J.; WENDE C. M. A.; MASCI, P. D. A Free radical hypothesis of lead poisoning and in born porphyria associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Quim. Nova*, v. 16, p. 385–392, 1993.

BOGDANCHIKOVA, A.; PESTRYAKOV, I.; TUZOVSKAYAC, T.A.; ZEPEDAA, M.H.; FARIASA, H.; TIZNADOA, O. Effect of redox treatments on activation and deactivation of gold nanospecies supported on mesoporous silica in CO oxidation. *Fuel* v. 110, Pages 48–53, 2013.

CLAUSEN, J.; RASTOGI, S. C. Heavy metal pollution among autoworkers. II. Cadmium, chromium, copper, manganese, and nickel. *British Journal of Industrial Medicine*, v. 34, p. 216-220, 1977.

CHINARD, F.P.; HELLERMAN, L. Determination of sulfhydryl groups in certain biological substances. *Methods of Biochemical Analysis*, v. 1, p. 1 – 26, 1954.

CUBADDA, A. Determination of cadmium, lead, iron, nickel and chromium in selected food matrices by plasma spectrometric techniques, *Microchem. J.*; v.79, p. 91–96 , 2005.

D'ANDREA, A. D. *DNA Repair Pathways and Human Cancer. The Molecular Basis of Cancer (Fourth Edition)*, 2015, Pages 47-66.e2

HANWELL, M. D.; CURTIS, D. E.; LONIE, D. C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G. R. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, v.4, n.17, 2012.

EMANUELLI, T.; ROCHA, J. B.; PEREIRA, M. E.; NASCIMENTO, P. C.; SOUZA, D. O.; BEBER, F. A. *Pharmacol. Toxicol.*, v.83, p. 95–103, 1998.

JAFFE, E. K. An unusual phylogenetic variation in the metal ion binding sites of porphobilinogen synthase. *Chem. Biol*, v. 10, p. 25–34, 2003.

DAVIS, J. R.; AVRAM, M. J. Correlation of the physicochemical properties of metal ions with their activation and inhibition of human erythrocytic aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) *in vitro*. *Toxicol. and Applied Pharmacol.* v. 55. p. 281-290,1980.

KORCAN S.; KORCAN, E.; CIĞERCI,H; KONUK., M. Screening of δ -aminolevulinic acid dehydratase from pseudomonas strains as biosensor for lead and some other metals contamination. *Environ. Monit. Assess.*,v. 134, p. 263–269, 2007.

MOCHIZUKI, N.; TANAKA, R.; GRIMM, B.; MASUDA, T.; MOULIN, M.; SMITH, A. G.; TANAKA, A.; TERRY, M. J. *Trends Plant. Sci.*, v. 15, p. 488-98, 2010.

NOGUEIRA C. W.; ROCHA, J. B. T. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch. Toxicol.* v. 85, p. 1313-1359, 2011.

ROCHA, J. B. T.; SARAIVA, R. A.; GARCIA, S. C.; GRAVINA, F. S.; NOGUEIRA, C. W. Aminolevulinic Dehydratase (Δ -ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. *Toxicology Research*, v. 1, p. 85, 2012

ROCHA, J. B., FREITAS, A. J., MARQUES, A. B., PEREIRA, A. E., EMANUELLI, T., SOUZA, D. O. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinic acid dehydratase of suckling rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* V. 26, p. 1077–1083, 1993.

ROCHA, J.B.T.; TUERLINCKX, S. M.; SCHETINGER, M. R.C.; FOLMER, V. Effect of Group 13 metals on porphobilinogen synthase in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 200 (2004) 169 – 176

RODRIGUES, A.L.; BELLINASSO, M.L.; DICK, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus maculatus* (pisces, pimelodidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 94b, p. 65–69, 1989.

ROCHA, J. B.; FREITAS, A. J.; MARQUES, A. B.; PEREIRA, A. E.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D. O. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinic acid dehydratase of suckling rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 26, p. 1077–1083, 1993.

SAIFULLAH, S.H.; KHAN, S. I. Distribution of nickel in a polluted mangrove habitat of the Indus Delta S.M. Baseline. *Marine Pollution Bulletin*, v. 44, p. 551–576, 2002.

SAROJ, C. B. Role of oxidative stress in nickel chloride-induced cell injury in rat renal cortical slices. *Biomed. Pharm.*, v.58, p. 1501–1510, 1999.

SASSA, S.; FUJITA, H.; KAPPAS, A.; KOTYK, A.; SKODA, J.; PACES, V.; KOSTKA, V. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. *Highlights of Modern Biochemistry*, p. 329–338, 1989.

SARKAR, F.W.; SUNDERMAN, JR. Nickel Toxicology in blood and kidney. Academic Press, p. 81–84, 1980.

SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme*, v. 28, p. 133, 1982.

SHUKLA, R.; BANSAL, V.; CHAUDHARY, M.; BASU, A.; BHONDE, R.R.; SASTRY, M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir*, v. 21, p. 10644–10654, 2005.

SMITH R. C.; VILLEL D. R; WILLIAM E.H. Oxidation of Thiols By Copper(II). *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*, v. 90, p. 147- 154, 1994.

STEWART J.J.P., MOPAC2012, 2012. Stewart Computational Chemistry. Colorado Springs, CO, USA. <http://OpenMOPAC.net>

STEWART, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods V: Modification of NDDO Approximations and Application to 70 Elements. *J. Mol. Mod.*, v. 13, p. 1173-1213, 2007.

TAN, X.; QIHAN, W.; YANYAN, C.; XUEYING, Z.; SHINGMING, W.; ZHIQIANG, G. Novel Association Between CD74 Polymorphisms and Hematologic Toxicity in patients with NSCLC After Platinum-Based Chemotherapy. *Clinical Lung Cancer*, v.15, p. 67-78, 1995.

THOMPSON, J.; JONES, D.; BEASLEY, W. The effect of metal ions on the activity of 8-aminolevulinic acid dehydratase. *British Journal of Industrial Medicine*, v.34, p. 32-36, 1977.

THOMPSON, J. D. D.; JONES, B. The effect of metal ions on the activity of 8-aminolevulinic acid dehydratase. *British Journal of Industrial Medicine*, v.34, p.32-36, 1977.

TOMOKUNI K. Interaction of zinc and other metal on the activity of erythrocyte aminolevulinic acid dehydratase *in vitro*. *The Journal of Toxicological Sciences*, v.4, p. 11-18, 1979.

TOMOKUNI, K.; ICHIBA, M. Interaction between nickel and lead in relation to porphyrin metabolism in mice. *Industrial Health*,v.28, p.145-149, 1990.

TREVISAN A., VENTURINI, M. B.; MARCO, L. D.; FABRELLO, A.; GIRALDO, M.; ZANETTI, E.; MARZANO, C.; FREGONA, D. Erythrocyte aminolevulinic acid dehydratase inhibition by cis-platin. *Toxicology Letters*, v. 152, p. 105–110, 2004.

7. Figures

Fig. 1A

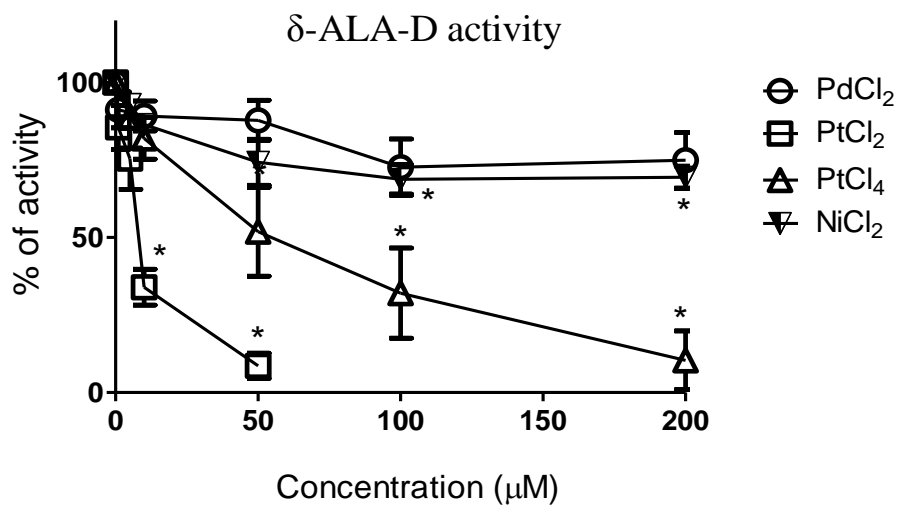


Fig 1A. Effect of Pd(II), Pt(II), Pt(II), and Ni(II), in porphobilinogen synthase from blood. The values are mean of percentage \pm SEM of three independent experiments. * indicates a significant difference (at least at $P < 0.05$) from respective control (without metal addition). Comparisons were done by Tukey's Multiple Comparison Test.

Table 2

	Control	Zn 500 μ M	DTT 800 μ M	Zn+DTT
Without metal	100,0 \pm 8,3	115,3 \pm 2,3	96,8 \pm 1,7	103,5 \pm 4,6
PdCl ₂ (50 μ M)	79,4 \pm 11,2	85,3 \pm 1,7	80,7 \pm 3,2	79,2 \pm 1,4
NiCl ₂ (50 μ M)	86,2 \pm 2,7	109,5 \pm 1,5	87,6 \pm 2,5	110,2 \pm 4,4
PtCl ₂ (50 μ M)	33,0 \pm 5,3	72,4 \pm 5,7	53,0 \pm 3,27	88,1 \pm 11,5
PtCl ₄ (100 μ M)	64,8 \pm 5,3	89,2 \pm 9,5	85,5 \pm 8,3	95,4 \pm 6,9
AgNO ₃ (10 μ M)	8,9 \pm 0,5	70,7 \pm 9,4	96,5 \pm 6,2	104,6 \pm 1,3
CuSO ₄ (50 μ M)	30,1 \pm 7,6	66,8 \pm 7,4	97,4 \pm 1,4	128,4 \pm 15,1
AuCl ₃ (50 μ M)	10,4 \pm 4,0	59,6 \pm 6,3	75,8 \pm 0,7	101,8 \pm 1,8

Table 2: Effects of DTT or Zn (II) on PBGS inhibition caused by metal, represent by percentage of activity. The values are mean of percentage of control \pm SEM of three independent experiments.

Fig. 1B

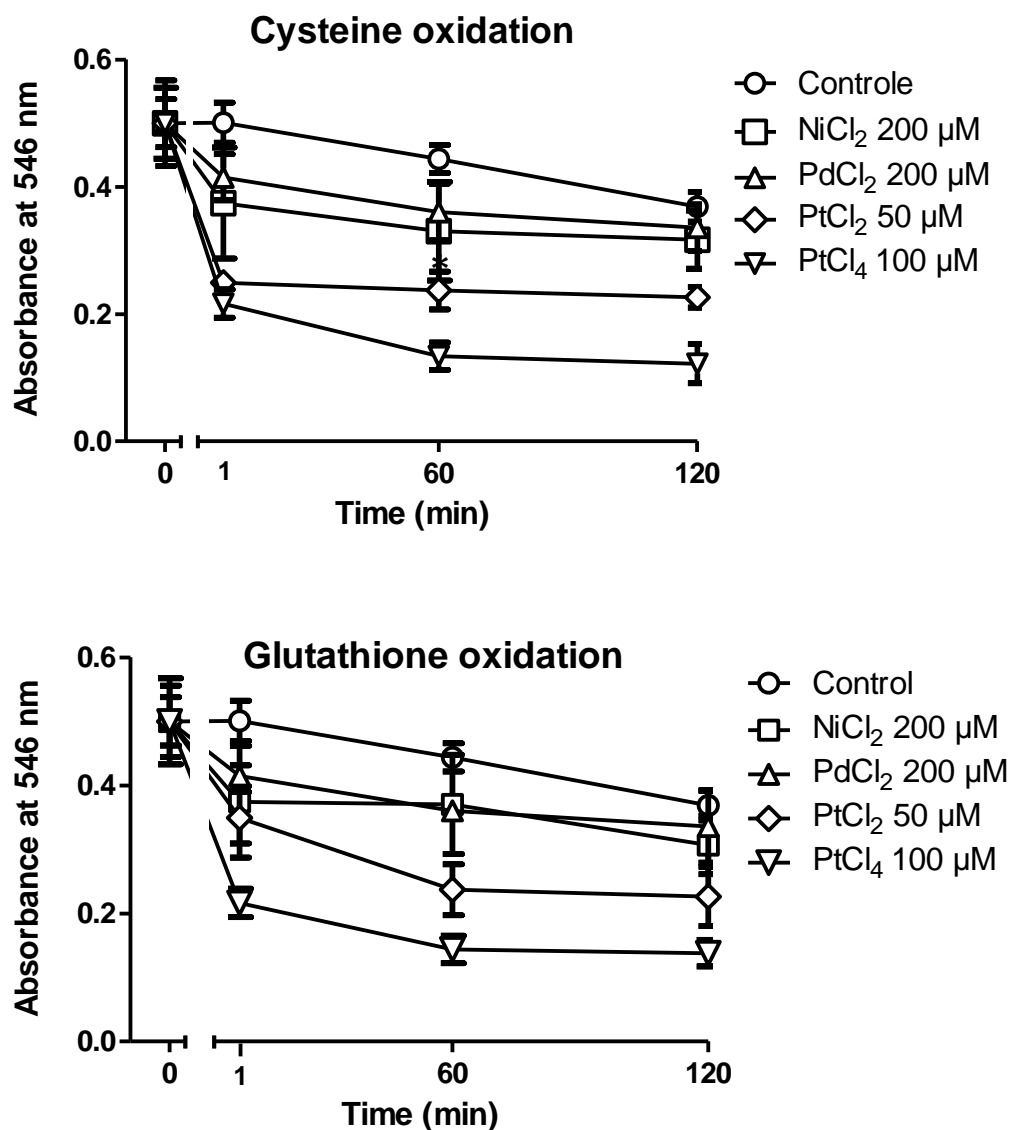


Fig. 1B. Determination of the rate of cysteine and glutathione oxidation caused by Pd(II), Pt(II), Pt(II), and Ni(II), according with Chinard and Hellerman's method. The values are mean of absorbance \pm SEM of three independent experiments.

Fig. 2.

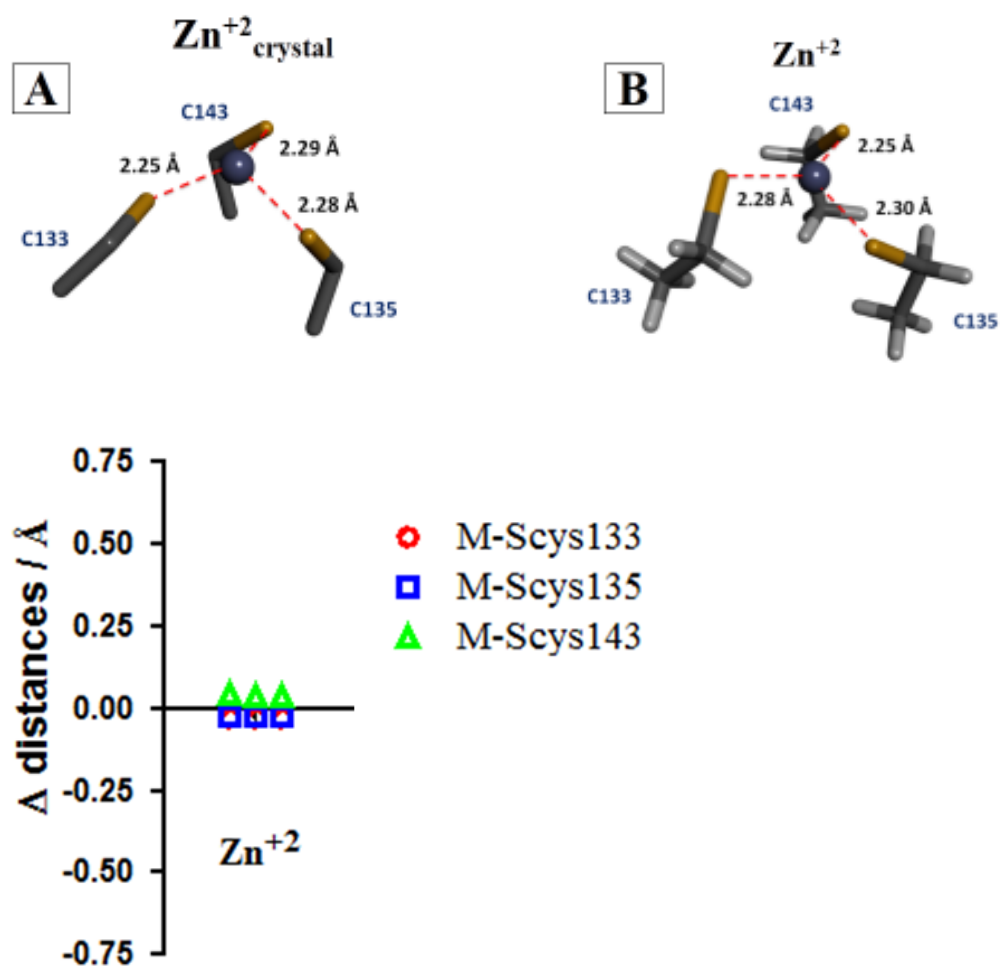


Fig. 2A. Comparison of the distances between Zn (II) and Cys from crystal 1H7N (A) and from semi empirical optimization (B)

Fig 1C

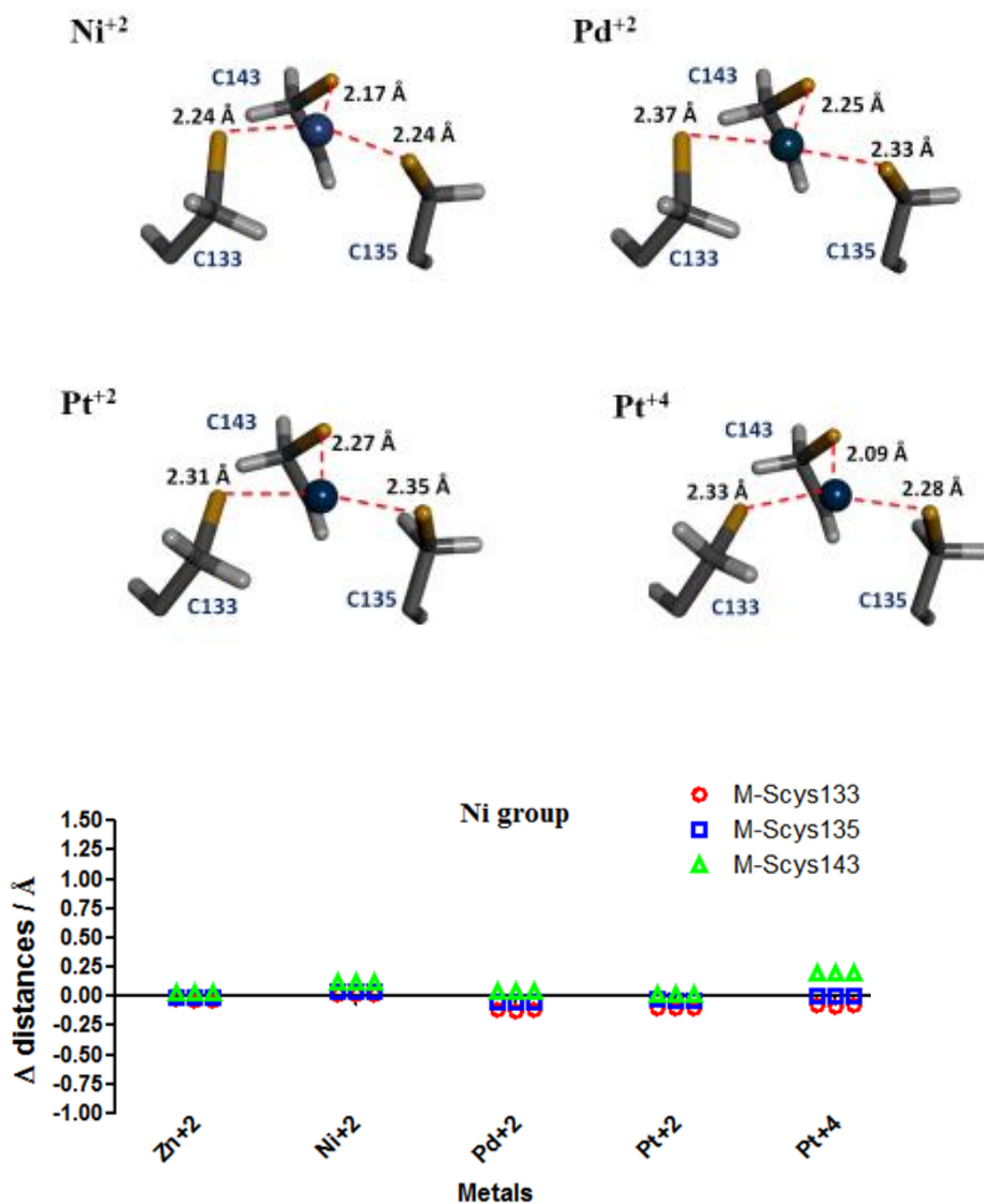


Fig. 1C. Difference Distances between metals (M) Ni (II), Pd (II), Pt (II) and Pt (IV) and Cys-C133, C135, C145.

TABLE 3

Metals	M--S C133	M--S C135	M--S C143	Geometry
Zn(II) Crystal	2,25	2,28	2,29	Tetrahedron
Zn(II)	2,28	2,29	2,26	Tetrahedron
Ni(II)	2,24	2,24	2,17	Square pyramidal distoted
Pd(II)	2,37	2,33	2,25	Square pyramidal distoted
Pt(II)	2,35	2,31	2,27	Square planar
Pt(IV)	2,33	2,28	2,09	Square pyramidal
Cu(II)	2,18	2,4	1,34	~ Tetrahedron
Ag(I)	5,66	6,14	6,32	-
Au(III)	2,22	2,23	2,23	Square pyramidal

Table 3: Difference Distances between metals (M) and the Cysteines (C) and geometry of each metal tested from 10 and 11 group.

Fig. 3A

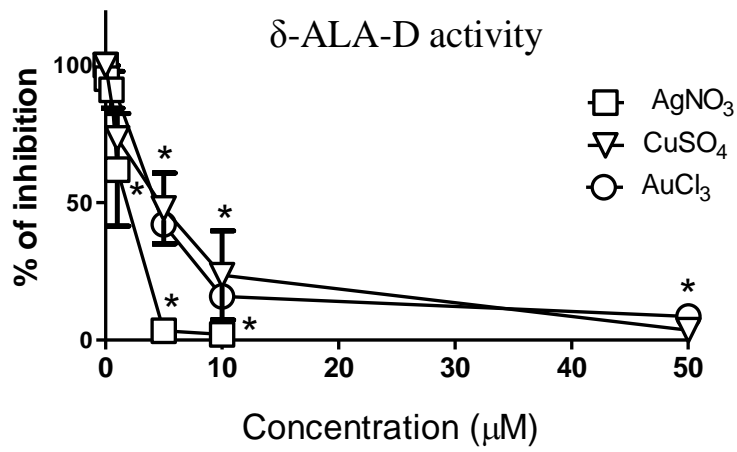


Fig 3A. Effect of AgNO_3 , CuSO_4 and AuCl_3 in porphobilinogen synthase from blood. The values are mean of percentage \pm SEM of three independent experiments. * indicates a significant difference (at least at $P < 0.05$) from respective control (without metal addition). Comparisons were done by Tukey's Multiple Comparison Test.

Fig. 3B

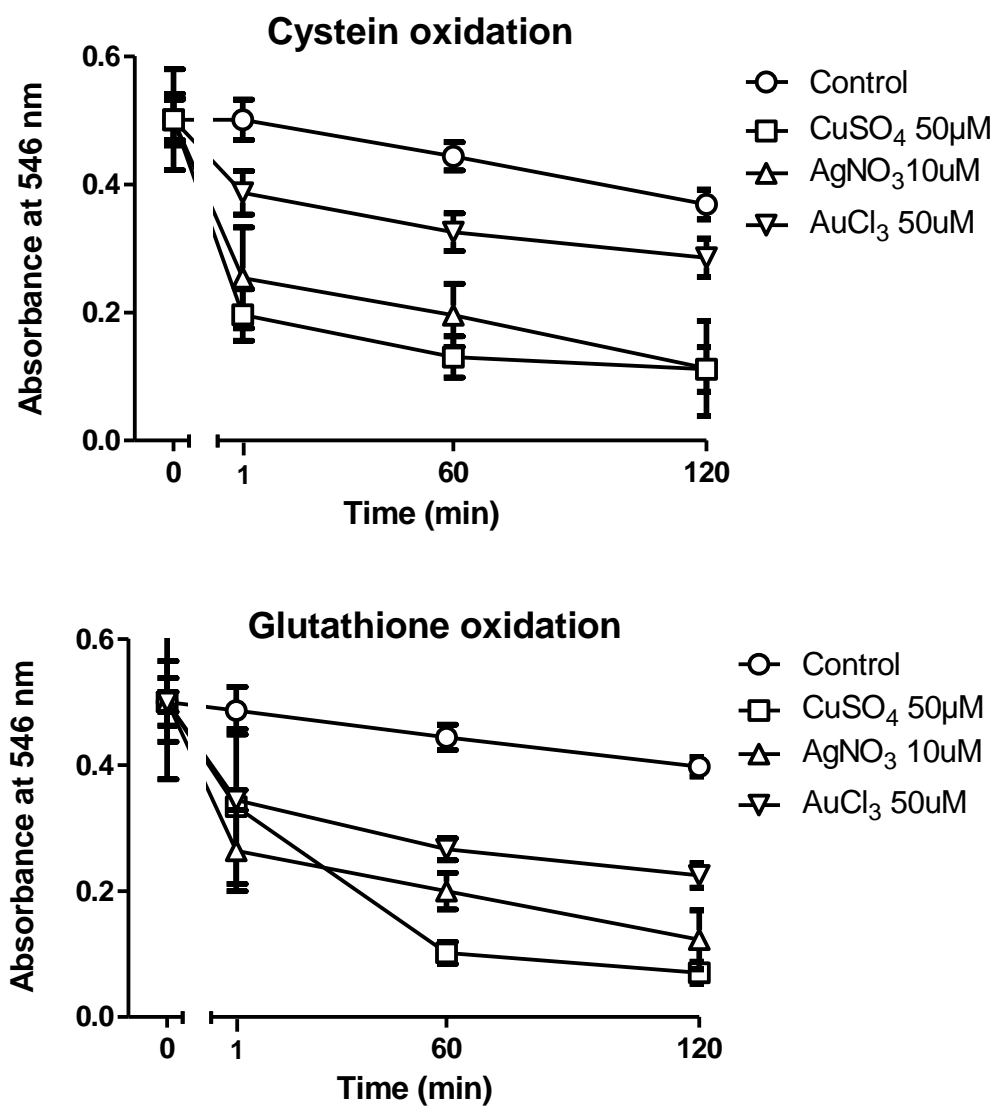


Fig. 3B. Determination of the rate of cysteine and glutathione oxidation caused by AgNO₃, CuSO₄ and AuCl₃ according with Chinard and Hellerman's method. The values are mean of absorbance ± SEM of three independent experiments.

Fig. 3C

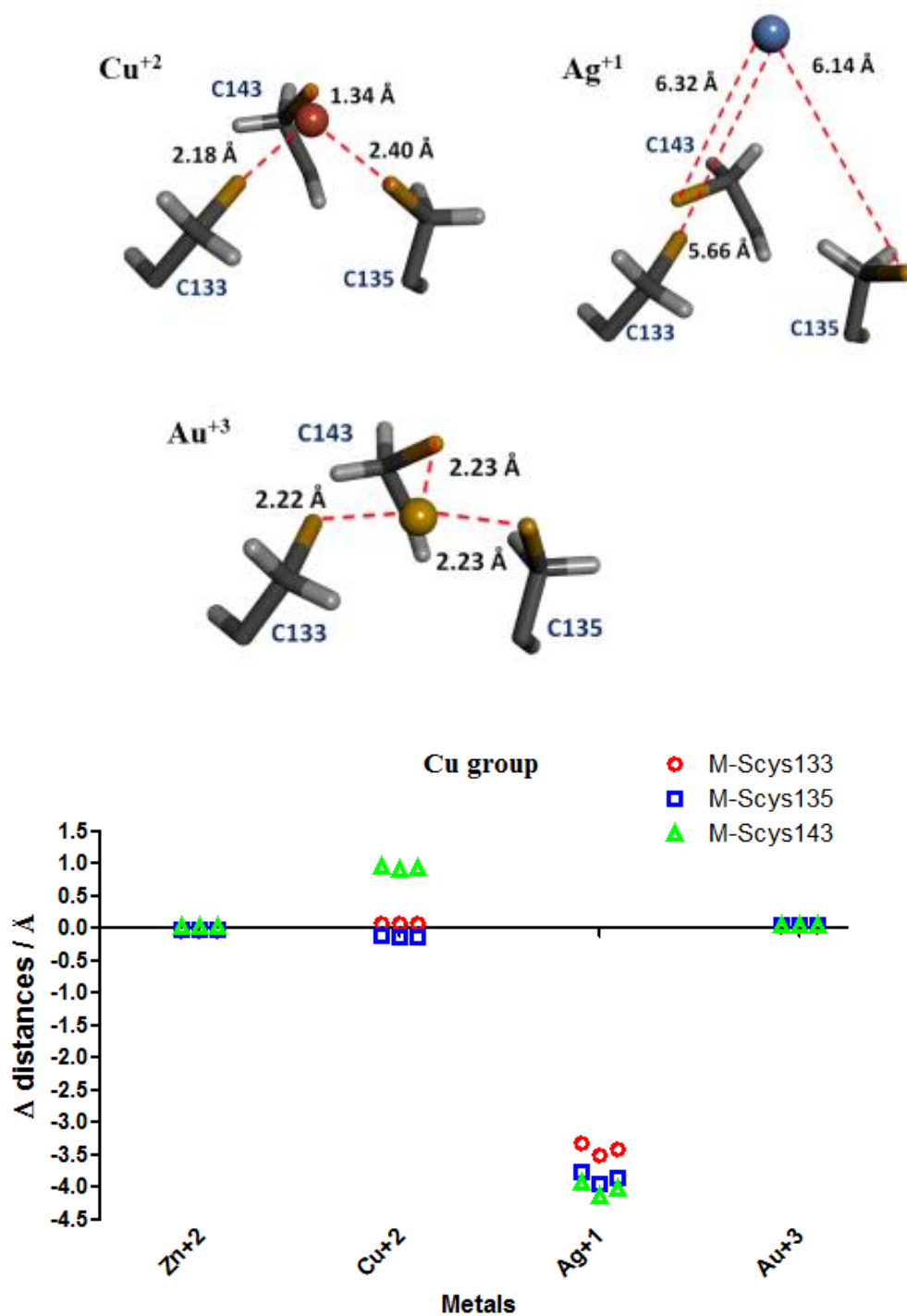


Fig. 3C. Difference Distances between metals (M) Cu(II), Ag(I), Au(III) and and the Cys-C133, C135, C145.

5. CONCLUSÕES

As interações dos metais dos grupos 10 e 11 da tabela periódica com o sítio ativo da enzima ALA-D não foram semelhantes. Em trabalhos anteriores demonstrou-se que para o grupo 13, o mecanismo de inibição de Al (III), Ga (III), In (III) e Tl (III) mudou de uma competição com Zn (II) para a oxidação dos grupos tióis da enzima, quando passamos do Al(III) para Tl(III) dentro do grupo de 13. Neste estudo, observou-se um pouco deste fenômeno no grupo 10. Ni(II) e Pd(II) causaram uma pequena inibição da enzima, que foi revertida por Zn (II). Pt (II) e Pt (IV) inibiram significativamente a atividade enzimática da ALA-D, no entanto, esta inibição foi atenuada por Zn (II) e DTT, indicando que à medida que avançamos do elemento mais leve para o elemento mais pesado, a inibição tende a mudar de uma competição por Zn (II) para oxidação de tióis.

No grupo 12, todos os metais inibiram ALA-D, e tanto DTT quanto Zn protegeram a enzima da inibição por estes metais, sugerindo inibição via oxidação de tióis. Embora dados *in silico* tenham indicado que todos os metais exceto a prata se coordenaram de modo parecido ao Zn (mas com uma geometria distinta) não temos como saber qual a capacidade que estes metais teriam de deslocar o Zn do centro ativo da enzima. Em outras palavras, teoricamente estes metais poderiam apenas se aproximar e oxidar os grupos tiólicos (como para Pt(II), Pt(IV) Cu(II) and Au (III)). No caso da Ag (II), talvez ela oxide tióis localizados no sítio A da enzima. De qualquer modo, os resultados apresentados na tabela 2 indicam que para a maioria dos elementos existiu uma competição entre o Zn (II) e os metais, porém a oxidação dos tióis parece ser mais importante do que a competição pelo Zn(II). Estudos mais detalhados são necessários para entender a interação destes metais com o sítio ativo ALA-D utilizando enzima purificada e removendo o Zn(II) por quelação.

6. PERSPECTIVAS:

- ➔ Avaliar a interação dos metais estudados com o sítio ativo ALA-D utilizando enzima purificada e removendo o Zn(II) por quelação.

- ➔ Avaliar a possível indução de estresse oxidativo em eritrócitos humanos pelos metais testados neste estudo que inibiram a enzima ALA-D (grupo 10 e 11), isto porque a inibição poderia estar levando ao aumento do substrato ácido 5 aminolevulinico, que é um conhecido composto pró-oxidante. Logo, devido à natureza sulfidrílica da ALA-D, o acúmulo de substrato poderia estar agravando a inibição da enzima.

- ➔ Verificar a capacidade dos metais induzirem diretamente o estresse oxidativo nos tecidos, uma vez que esta enzima é sensível a uma variedade de situações associadas com o stress oxidativo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, W. B.; SANTOS, H.F. Métodos teóricos para a compreensão da estrutura da matéria. Cader. Tem. de Quím. Nova na Esc., v. 4 , p. 6-13, 2001.

ANDERSON, S.; SASSA, D.F.; BISHOP, R.; DESNICK, I.; C.R. SCRIVER, A.L. BEAUDET, W.S. SLY, D. VALLE (Eds.). Porphyrins: An overview. The Metab. Basis of Inher. Diseases, v. 8, p. 2991–3062, 2001.

ANTELT, S.; CREUTZENBERG, O.; KOCK, H.; LEVSEN, K.; NACHTIGALL, D.; HEINRICH, U. Bioavailability of fine dispersed platinum as emitted from automotive catalytic converters: a metal study. Sci Total Environ. v. 228; p. 219–42, 1999.

AWASTHI, K.; AWASTHI, A.; KUMAR, N. Silver nanoparticle induced cytotoxicity, oxidative stress, and DNA damage in CHO cells. J Nanopart Res; V. 15, p. 1898, 2013.

BECHARA, E. J. M.; MEDEIROS, M. H. G.; MONTEIRO, H. P.; HERMES-LIMA, M.; PEREIRA, B.; DEMASI, M.; COSTA, A. A.; ADBALLA, D. S. P.; ONUKI, J.; WENDE C. M. A.; MASCI, P. D. A Free Radical Hypothesis Of Lead Poisoning And In Born Porphyria Associated With 5-Aminolevulinic Acid Overload. Quim. Nova, v. 16, p. 385–392, 1993.

BARUWATI, B.; SIMMONS, S.; VARMA, R. “Green” synthesized and coated nanosilver alters the membrane permeability of barrier (intestinal, brain endothelial) cells and stimulates oxidative stress pathways in neurons. ACS Sustainable Chem Eng;v. 1, p.753-9, 2013.

BOESE, Q. F.; SPANO, A. J.; LI, J.; TIMKO, M. P. δ -aminolevulinic acid dehydratase in pea (*Pisum sativum* L.). Identification of an unusual metal-binding domain in the plant enzyme. J. Biol. Chem., v. 266, p. 17060-17066, 1991.

CARDINAL, J.; KLUNE, J.R.; CHORY, E.; JEYABALAN, G.; KANZIUS, J.S.; NALESNIK, M.; GELLER, D.A. Noninvasive radiofrequency ablation of cancer targeted by gold nanoparticles. Surgery, v.144, p.125–132, 2008.

CHEH, A.; NEILANDS, J. B. Zinc, an essential metal ion for beef liver delta aminolevulinatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 55, p. 1060-1063, 1973.

CLAUSEN, J.; RASTOGI, S. C. Heavy metal pollution among autoworkers. II. Cadmium, chromium, copper, manganese, and nickel. *British Journal of Industrial Medicine*, v. 34, p. 216-220, 1977

CONNOR, E.E.; MWAMUKA, J.; GOLE, A.; MURPHY, C.J.; WYATT, M.D.; 2005. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, v.1, p. 325–327, 2005.

DANI, R.K.; KANG, M.; KALITA, M.; SMITH, P.E.; BOSSMANN, S.H.; CHIKAN, V. MspA porin-gold nanoparticle assemblies: enhanced binding through a controlled cysteine mutation. *Nano Lett.*, v. 8, p. 1229–1236, 2008.

DRAPAL, S.; POMAJBIK, J. Segregation in precious-metal dental-casting alloys. *J. Ent. Es.*, p. 72, v. 587 - 591, 1993.

ROCHA, M.E.; DUTRA, F.; BANDY, B. Oxidative damage to ferritin by 5-aminolevulinic acid. *Arch Biochem Biophys*, v. 409, p. 49–56, 2003.

EISEMAN, J. L.; RIBAS, J. L. Acute Nephropathy Induced by Gold Sodium Thiomalate: Alterations in Renal Heme Metabolism and Morphology. *Toxicol And Applied Pharmacol.*, v. 91, p. 193-203, 1987.

EMANUELLI, T.; ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E.; NASCIMENTO, P.C.; SOUZA, D.O.; BEBER, F.A. Delta-Aminolevulinatase inhibition by 2,3- Dimercaptopropanol is mediated by chelation of zinc from a site involved in maintaining cysteinyl residues in a reduced state. *Pharmacol. Toxicol.*, v. 83, p. 95–103, 1998.

ERDTMAN, E.; BUSHNELL, E. A. C.; GAULD, J.W.; ERIKSSON, L. A. Computational insights into the mechanism of porphobilinogen synthase. *J. Phys. Chem. B.*, v. 114, p. 16860–16870, 2010.

GAD. S.C. Palladium. *Encyclopedia of Toxicol.*, v. 3, p. 751-53, 2014.

GIBSON, K. D.; NEUBERGER, A.; SCOTT, J. J. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Biochem. J.*, v. 61, p. 618-629, 1955.

GOODMAN, J.E.; PRUEITT, R.L.; DODGE, D.G.; THAKALI, S. Carcinogenicity assessment of water-soluble nickel compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* v. 39, p. 365–417, 2009.

GIODA, L.A.; LISSNER, A.; PRETTO, M.R.C.; ROCHA, J.B.T.; NETO, J.R.; MORSCH, V.M.; LORO, V.L. Exposure to sublethal concentrations of Zn(II) and Cu(II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. *Chemosphere*, v. 69, p.170–175, 2007.

GO, R.S.; ADJEI, A.A. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J. Clin. Oncol.*, v.17, p. 409–422, 1999.

HAASE, A.; ROTT, S.; MANTION, A. Effects of silver nanoparticles on primary mixed neural cell cultures: uptake, oxidative stress and acute calcium responses. *Toxicol Sci.*, v.126, p. 457-68, 2012.

OBEROI, H.S.; KABANOV, N.V.; BRONICH, T.K. Nanocarriers for delivery of platinum anticancer drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 65, p.1667–1685, 2013.

HE, D.; DORANTES-ARANDA J.; WAITE, T. Silver nanoparticle ealgae interactions: oxidative dissolution, reactive oxygen species generation and synergistic toxic effects. *Environ Sci Technol*; v. 46, p. 8731-8, 2012.

HEINEMANN, I. L.; JAHN, M.; JAHN, D. The biochemistry of heme biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 474, p. 218–251, 2008.

HOLBROOK, D. J.; WASHINGTON M. E.; LEAKE H. B.; BRUBAKER P. E. Studies on the evaluation of the toxicity of various salts of lead, manganese, platinum, and palladium. *Environ. Health Perspect.*; v.10, 95 -101, 1975.

HOLLER, J.; NORDBERG, G.; SILVER, F. B.; Nordberg, G.F.; Fowler, B.A.; Nordberg, M.; Friberg, L.T. Handbook on the Toxicology of Metals. Academic Press, v.3, p. 809–814, 2007

JAFFE, E. K. An unusual phylogenetic variation in the metal ion binding sites of porphobilinogen synthase. *Chem. Biol.*, v. 10, p. 25–34, 2003.

JAFFE, E. K.; ALI, S.; MITCHELL, L. W.; TAYLOR, K. M.; VOLIN, M.; MARKHAM, G. D. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of *Escherichia coli* porphobilinogen synthase. *Biochem.*, v. 34, p. 244-251, 1995.

JAFFE, E. K.; HANES, D. Dissection of the early steps in the porphobilinogen synthase catalysed reaction- Requirement for Schiff's base formation. *J. Biol. Chem.*, v. 261, p. 9348-9353, 1986.

JAVED, A.; GONDAL, J. L.; EISEMAN, A.; ALVARES, P. Regulation of Heme Metabolism and Monooxygenases in Liver and Kidney: Influence of Therapeutically Used Gold Compounds. *J. Of Pharmac. And Exp. Therapeutics.*, v. 241, p. 2, 1987.

JAYASEELAN, C.; RAHUMAN, A.; RAMKUMAR, R.; PERUMAL, P.; RAJAKUMAR, G.; VISHNU, A. Effect of sub-acute exposure to nickel nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Ecotoxicol. and Environ. Safety*, v. 107, p. 220–228, 2014.

JOHNSON, D.; PREVOST, R.; TILLERY, J.; CAMAN, D.; HOSENFELD, J. Baseline levels of platinum and palladium in human tissue. *Environ. Protect. Agency*, v. 600, p.76 - 36, 1976.

JOHNSTON, H.; GARY, H.; CHRISTENSEN, F. A review of the *in vivo* and *in vitro* toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.*, v. 40, p. 328-46, 2010.

JOSEPH, R.; AVRAM. D. M. J. Correlation of the physicochemical properties of metal ions with their activation and inhibition of human erythrocytic S-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) *in vitro*. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, v. 55, p. 281-290, 1980.

KIELHORN, J.; MELBER, C.; KELLER, D.; MANGELSDORF, I. Palladium – A review of exposure and effects to human health international. *J. of Hygiene and Environ. Health.* v. 205, p. 417-432, 2002.

KLASEN. H.J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver Burns. v. 26, p. 131-138, 2000.

KITCHEN, D.B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews*, v. 3, p. 935–949, 2004.

LAWRENCE, S.H.; RAMIREZ, U.D.; SELWOOD, T; STITH, L.; JAFFE, E.K. Allosteric inhibition of human porphobilinogen synthase. *J. Biol. Chem.*, v. 284, p. 35807-35187, 2009.

LIPPMANN, M.; ITO, K.; HWANG, J.-S.; MACIEJCZYK, P.; CHEN, L.-C. Cardiovascular effects of nickel in ambient air. *Environ. Heal. Perspect*, v.114, p.1662–1669, 2006.

LI, J.L.; WANG, L.; LIU, X.Y.; ZHANG, Z.P.; GUO, H.C.; LIU, W. M.; TANG, S.H. In vitro cancer cell imaging and therapy using transferrin-conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett.* v. 274, p. 319–326, 2009.

MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H.J.C; DARDENNE, L.E; MORGON, N. H.; COUTINHO, K. Métodos de docking receptor ligante para o desenho racional de compostos

bioativos. In: Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. São Paulo: Livraria da Física, p. 489-531, 2007.

MAYER, C.; KLEIN, R.G.; WESCH, H.; SCHMEZER, P. Nickel subsulfide is genotoxic in vitro but shows no mutagenic potential in respiratory tract tissues of Big Blue (TM) rats and Muta (TM) Mouse mice in vivo after inhalation. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* v. 420, p. 85–98, 1998.

MCSHAN, D.; PARESH C.; HONGTAO, Y. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 22, p. 116-127, 2014.

MELBER, C.; KELLER, D.; MANGELSDORF, I. Palladium: Environmental Health Criteria. Geneva. World Health Organization; v. 222, 2002.

MIRSATTARI, S.M.; SHARPE, M.D.; YOUNG, G.B. Treatment of refractory status epilepticus with inhalational anesthetic agents isoflurane and desflurane. *Archives of Neurology*, v. 61, p. 1254–9, 2004.

MIRSATTARI, S.M.; HAMMOND, R.R.; SHARPE, M.D.; LEUNG, F.Y.; YOUNG, G.B. Myoclonic status epilepticus following repeated oral ingestion of colloidal silver. *Neurology*, v. 62, p.1408–1410, 2004.

MOCHIZUKI, N.; TANAKA, R.; GRIMM, B.; MASUDA, T.; MOULIN, M.; SMITH, A. G.; TANAKA, A.; TERRY, M. Tetrapyrrole Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *J.Trends Plant Sci* 2010, 15 (9), 488-98.

MORAES-SILVA, L.; BUENO, T. M.; FRANCISCATO, C.; INEU R. P.; PEREIRA, M. E. Effectiveness of Copper Chloride in Protecting Against Alterations Induced by Mercury Chloride in Newborn Rats. *J. Biochem. Molecular Toxicology*, v. 26, Number 9, 2012.

MURIS, J.; FEILZER, C. J.; KLEVERLAAN, T.; RUSTEMEYER, I.W.; VAN HOOGSTRATEN, R. J.; SCHEPER, B. M. E. Palladium-induced Th2 cytokine responses reflect skin test reactivity. *Allergy*, v. 67, p. 1605–1608, 2012.

MWILU, S.K.; EL BADAWY, A.M.; BRADHAM, K. Changes in silver nanoparticles exposed to human synthetic stomach fluid: effects of particle size and surface chemistry. *Sci. Total Environ.*, v. 447, p. 90–98, 2013.

NANDI, D. L. δ -aminolevulinate acid synthase of *Thodopseudomas spheroides*. Binding of pyridoxal phosphate to enzyme. *Z. Naturforsch.* v. 33, p. 799-800, 1978.

NOGUEIRA C. W.; ROCHA, J.B.T. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch. Toxicol.* v. 85, p. 1313-1359, 2011.

NYARKO, E.; TATSURU H.; DENNIS J.; AHSAN H.; YURI K.; NIKOLSKAIA, O.; FUKUMA, T. In vitro toxicity of palladium(II) and gold(III) porphyrins and their aqueous metal ion counterparts on *Trypanosoma brucei* growth. *Chemico-Biological Interactions* v.19, p.148, 2004.

OGUNSEITAN, O.A.; YANG, S.; ERICSON J. Microbial δ -aminolevulinate dehydratase as a biosensor of lead bioavailability in contaminated environments. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 32, p. 1899–1906, 2000.

OSTERBERG, R.; LIGARDEN, R.; PERSON, D. Copper(I) complexes of penicillamine and glutathione. *J. Inorg. Biochem.*, v. 10, p. 341-355, 1979.

RAUCH, J.N., PACYNA, J.M. Earth's global Ag, Al, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, and Zn cycles. *Global biogeochem. cycles*, v. 23, p. 1-16, 2009.

REIDY, B.; HAASE, A.; LUCH, A. Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: a critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. *Materials*, v. 6, p. 2295-350, 2013.

ROCHA, J.B.T.; ROCHA, L.K.; EMANUELLI, T., PEREIRA, M.E. Effect of mercuric chloride and lead acetate treatment during the second stage of rapid post-natal brain growth on the behavioral response to chlorpromazine and on delta-ALA-D activity in weaning rats. *Toxicol. Lett.*, v.125, p.143–150, 2001.

ROCHA, J B.; FREITAS, A. J.; MARQUES, A. B.; PEREIRA, A. E.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D. O. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinate dehydratase of suckling rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 26, p. 1077–1083, 1993.

ROCHA, J.B.T.; SANDRO M.; TUERLINCKX, M.; SCHETINGER, R.C.; FOLMER, V. Effect of Group 13 metals on porphobilinogen synthase in vitro. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, v. 200, p. 169 – 176, 2004.

ROSENBERG, B.; VANCAMP, L.; KRIGAS, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, v. 205, p. 698–699, 1965.

ROCHA, J. B. T.; SARAIVA, R. A.; GARCIA, S. C.; GRAVINA, F. S.; NOGUEIRA, C. W. Aminolevulinate Dehydratase (Δ -Ala-D) As Marker Protein Of Intoxication With Metals And Other Pro-Oxidant Situations. *Toxicol. Res.*, v. 1, p. 85, 2012.

ROCHA, J B.; FREITAS, A. J.; MARQUES, A. B.; PEREIRA, A. E.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D. O. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinate dehydratase of suckling rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 26, p. 1077–1083, 1993.

RODRIGUES, A.L.; BELLINASSO, M.L.; DICK, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinate dehydratase of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 94b, 65–69, 1989.

SASSA, S.; FUJITA, H.; KAPPAS, A.; KOTYK, A.; SKODA, J.; PACES, V.; KOSTKA, V. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. *Highlights of Modern Biochemistry*, p. 329–338, 1989.

SCHULTZ, I.; MELLE, B.; LENZ, E. Relationship between biocorrosion and noble metal content of dental alloys. *Dtsch. Zahnärztl.* v.52, p. 355 - 360, 1997.

SHI, J.; XIA S.; XIAOYAN, Z.; HONGWU, Z. Amino acid-dependent transformations of citrate-coated silver nanoparticles: Impact on morphology, stability and toxicity. *Toxicology Letters*, v. 229, p. 17–24, 2014.

SHIBATA, H.; OCHIAI, H. Purification and properties of delta-aminolevulinate acid dehydratase from radish catyledons. *Plant. Cell Physiol.*, v. 18, p. 421-429, 1977.

SHUKLA, R.; BANSAL, V.; CHAUDHARY, M.; BASU, A.; BHONDE, R.R.; SASTRY, M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview, v.21,p. 10644–10654, 2005.

SMITH R. C.; REED, V. D.; HILL, W. E. Oxidation of thiols by copper (II). *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*, v. 90, p. 147- 154, 1994.

THOMAS, I. Gold therapy and its indications in dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v. 16, p. 845-54, 1987.

JILL, T.; JONES, D. D.; BEASLEY. W. H. The effect of metal ions on the activity of 8-aminolevulinic acid dehydratase. *British Journal of Industrial Medicine*, v. 34, p. 32-36, 1977.

TIMBRELL, J. A. *Principles of Biochemical Toxicology*, 2 ed, Biochemical Toxicology School of Pharmacy University of London, 1991.

TOMOKUNI K. Interaction of zinc and other metal on the activity of erythrocyte aminolevulinic acid dehydratase *in vitro*. The Journal of Toxicological Sciences, v. 4, p. 11-18, 1979.

TOMOKUNI, K.; ICHIBA, M. Interaction between Nickel and Lead in Relation to Porphyrin Metabolism in Mice Industrial Health, v. 28, p. 145-149, 1990.

TREVISAN, A.; VENTURINI, B.; DI MARCO, L.; FABRELLO, A.; GIRALDO, M.; ZANETTI, E.; MARZANO, C.; FREGONA, D. Erythrocyte aminolevulinic acid dehydratase inhibition by cis-platin. Toxicology Letters, v. 152, p. 105–110, 2004.

TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T.; SANO, S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. Biochim. Biophys. Acta, v. 570, p. 167-178, 1979.

XU, S.; HAN, X. A novel method to construct a third-generation biosensor: self assembling gold nanoparticles on thiol-functionalized poly(styrene-co-acrylic acid) nanospheres. Biosens. Bioelectron. v.19, p.1117–1120, 2004.

WATAHA, J. C.; HANKS, C. T. Biological effects of palladium and risk of using palladium in dental casting alloys. J. Oral Rehabil., v. 23, p. 309 - 320, 1996.

WIJNHOFEN, S.; PEIJNENBURG, W.; HERBERTS, C. Nano-silver review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. Nanotoxicity, v.3, p. 109-38, 2009.

YU S-J, YIN Y-G, LIU J-F. Silver nanoparticles in the environment. Environ. Sci. Proc. Impacts, v.15, p. 78-92, 2013.

ZHANG, X., GUO, Q., CUI, D. Recent advances in nanotechnology applied to biosensors. Sensors, v. 9, p.1033–1053, 2009.