

Área: Ciências Biológicas/ Subárea: Biologia molecular

## EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA TRIPANOTIONA REDUTASE DE *Leishmania braziliensis* PARA USO COMO ALVO MOLECULAR

**AMORIM, Juliana Aparecida Vieira<sup>1,2</sup>; SOUZA, Mateus Farias<sup>2,3</sup>; MACEDO, Jamile Mariano<sup>2,4</sup>; LIMA, Anderson Maciel<sup>2</sup>; SILVA, Pricila Gomes<sup>3,5</sup>; GUSMÃO, Maria Elisabeth Moreira de Lima<sup>1,2</sup>; RIBEIRO, João Victor Lopes de Oliveira<sup>1,2</sup>; MARTINS, Marcos Antônio Cabral<sup>2</sup>; KAYANO, Anderson Makoto<sup>2,6</sup>; SOARES, Andreimar Martins<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Centro Universitário São Lucas Afya

<sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia de Proteínas e Compostos Bioativos (LABIOPROT), FIOCRUZ Rondônia

<sup>3</sup>Universidade Federal de Rondônia (UNIR)

<sup>4</sup>Instituto Federal de Rondônia (IFRO)

<sup>5</sup>Centro de Estudo de Biomoléculas Aplicada à Saúde (CEBio)

<sup>6</sup>Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM/SESAU)

**INTRODUÇÃO:** Ao longo dos anos tem aumentado o número de pesquisas que investem na identificação de alvos terapêuticos promissores no combate às Doenças Negligenciadas (DN). Nesse contexto, a Tripanotiona redutase (TR), uma enzima específica de parasitos da família *Trypanosomatidae*, da qual pertencem os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, agentes etiológicos da Doença de Chagas, Tripanossomíase africana e Leishmaniose, respectivamente, têm se mostrado como alvo bioquímico de interesse médico.

**OBJETIVO:** Por essa razão, o presente trabalho teve como objetivo, obter a enzima recombinante tripanotiona redutase (TRLb-*Leishmania braziliensis*) na forma ativa e elevado grau de pureza. **METODOLOGIA:** Para obter a enzima recombinante, foi utilizada a sequência do RNA mensageiro identificado de 1475 pb (chromosome: NC\_009298.3 LBRM\_05\_0350), que corresponde a sequência de aminoácidos do alvo a ser expresso. Para obtenção da proteína recombinante, a sequência foi inserida no vetor de expressão pET38(a+), contendo a região codificante de polihistidinas e sítios de restrição NcoI e XhoI. A transformação bacteriana fez-se por meio da cepa [BL21(DE3)], utilizando choque térmico, na lise celular foi utilizada lisoenzima e sonicação, para a sua purificação foi executada cromatografia por afinidade em resina de agarose com íons de níquel Ni-NTA imobilizados (ácido níquelnitriotriacético), para constatar a expressão da TRLb na forma solúvel no citoplasma, foi realizada gel SDS-PAGE após 4 horas de indução por IPTG Isopropil- $\beta$ -1-tiogalactopiranosídeo. Na quantificação da proteína recombinante usou-se o método DC protein e na atividade enzimática, o substrato T[s]2 (sal de trifluoroacetato de tripanotiona). **RESULTADO:** No processo transformação, foram obtidas colônias isoladas das cepas [BL21(DE3)] com formas uniformes, a colônia isolada selecionada foi inserida em meio LB para o pré-inóculo. Após a indução foi realizado a cromatografia com a coluna contendo íons de níquel imobilizados em agarose. O rendimento da proteína purificada foi de 0,300 mg/mL, no gel SDS-PAGE de

12,5% foi possível observar uma única banda de 54 kDa na presença do agente redutor, após a focalização isoelétrica em sistema de eletroforese bidimensional foi identificado o pI aproximado de 6 e a massa de 54 kDa com alto grau de pureza. Na atividade enzimática, foi avaliada a capacidade de catálise de reação na concentração de 0,2 µg/mL, conforme descrito por Garay (2018). **DISCUSSÃO:** Com os resultados obtidos no presente trabalho, é possível afirmar que a enzima tripanotiona redutase foi expressa, purificada e caracterizada, coincidido com os parâmetros da literatura. **CONCLUSÃO:** Diante da aplicação de técnicas de expressão heteróloga foi possível obter a enzima TRLb, a qual, quando purificada, apresentou elevado grau de pureza, conservando suas propriedades catalíticas.

**AGRADECIMENTO:** FAPERO, LABIOPROT, CEBio, UNIR, FIOCRUZ-RONDÔNIA

**PALAVRA-CHAVE:** Tripanotiona redutase, alvo molecular, *Leishmania braziliensis*.

e-mail: juliiianapvieira@gmail.com, andreimarsoares@gmail.com