

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DO ALVO MOLECULAR TR
RECOMBINANTE DE *Leishmania braziliensis***

**MALAQUIAS, Sara Cristina Oliveira¹; SOARES, Andreimar¹; KUEHN, Christian Collins²;
GARAY, Ana Fidelina Gomez¹**

¹ Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde, CEBio, FIOCRUZ Rondônia.

² Universidade Federal de Rondônia

INTRODUÇÃO: O gênero *Leishmania* compreende um grupo amplo de protozoários flagelados. Três manifestações clínicas da doença são possíveis: a leishmaniose visceral, a cutânea e a mucocutânea. O desenvolvimento de novos candidatos a fármacos está em progresso, com a exploração de vias metabólicas do parasita em busca de alvos e compostos com potencial de interação. A Tripanotona redutase é uma enzima presente nos tripanosomatídeos, envolvida nos processos de proteção contra espécies reativas de oxigênio e considerada um alvo importante, pois sua função afeta de forma direta o ciclo vital do parasita.

OBJETIVOS: O objetivo deste trabalho foi expressar, purificar e caracterizar bioquimicamente a enzima recombinante Tripanotona redutase de *Leishmania braziliensis* (TRr). **MATERIAIS E MÉTODOS:** Utilizou-se o plasmídeo sintético recombinante do gene da TR de *L. braziliensis* inserido no vetor pET 28 (a+). Realizou-se a transformação de bactérias *E. coli*, cepas BL21(DE3) e TG1 quimiocompetentes. A cultura foi semeada em placas de Petri (90 x15) com meio de cultura Luria Bertani (LB) ágar e canamicina. As colônias transformantes foram cultivadas em 5 ml de LB líquido com canamicina em agitação (250 rpm) e 37 °C durante 16 horas, e logo da cultura de BL21 (DE3) levou-se uma alíquota em relação 1:100 com meio LB e antibiótico para indução. Realizou-se a medição da densidade ótica (D.O.) a 600 nm até chegar ao valor de 0,6. Posteriormente a cultura foi induzida em distintos tempos (4-12 h) e concentrações de IPTG (0-1mM), foram separadas alíquotas para visualização em gel de poliacrilamida 12,5% com tampão DTT e SDS. De cada condição da cultura induzida realizou-se a lise celular com TRIS 50 mM, pH 8,0 e lisozima e posteriormente submetidas a sonicação. Para purificação, utilizou-se o método de cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel e tampão imidazol/fosfato de sódio/cloreto de sódio 10, 30, e 500 mM. Posteriormente a amostra foi submetida a análise por eletroforese SDS-PAGE 12,5 %. Realizou-se a extração e quantificação plasmidial a partir de 5 mL de cultura de TG1 de 16 h. **RESULTADOS:** Foram obtidas colônias uniformes, demonstrando que as transformantes incorporaram o plasmídeo. Houve maior expressão da enzima após 4 h de indução e 1mM de IPTG. Na cromatografia, foi possível eluir a enzima a 280 nm de absorbância, com aproximadamente 70% de tampão de eluição. A enzima purificada teve rendimento de 20 mg/L. Finalmente, realizou-se um gel SDS-PAGE 12,5%, em condições redutoras e não redutoras. Obteve-se rendimento plasmidial de 38,4 ng/μL. **CONCLUSÃO:** Bactérias quimiocompetentes de *E. coli* foram transformadas, induzidas e posteriormente lisadas para purificar a proteína de interesse, e amplificação do plasmídeo, atingindo os objetivos propostos para esse trabalho.



Simpósio Regional de Ciência e Tecnologia e Inovação da Amazônia Occidental

Agradecimentos: CAPES; FAPERO; CEBio; UNIR.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*, oxidoreductase, inibidores, extratos vegetais, toxinas de venenos.

saraunir12@gmail.com