

Simpósio de Integração Acadêmica

“Bicentenário da Independência: 200 anos de ciência, tecnologia e inovação no Brasil e 96 anos de contribuição da UFV”

SIA UFV 2022



Teste de expressão da E-NTPDase2 de *Leishmania infantum* em sistema eucariótico LEXSY (Leishmania Expression System)

RODRIGUES, V. A.¹; RIBEIRO, I. C.²; FIETTO, J. L. R.³

¹ Discente do curso Bacharelado em Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa; vitoria.a.rodrigues@ufv.br

² Doutoranda vinculada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica Aplicada da Universidade Federal de Viçosa; isadora.cunha@ufv.br

³ Docente do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa; jufietto@ufv.br

Palavras-Chave: E-NTPDase2, *Leishmania infantum*, sistema LEXSY

Modalidade: Pesquisa; **Grande área:** Ciências Biológicas e da Saúde; **Área temática:** Bioquímica

Introdução

As E-NTPDases são enzimas que hidrolisam nucleotídeos tri e difosfatados extracelulares e que estão presentes em muitos organismos, como os protozoários do gênero *Leishmania*. Uma dessas enzimas, a E-NTPDase2 de *Leishmania infantum* (LiNTPDase2), tem sido apontada como um importante fator de virulência e um bom alvo para o desenvolvimento de novos fármacos para tratamento da leishmaniose visceral, doença tropical negligenciada. Entretanto, a LiNTPDase2 ainda não foi expressa em um organismo que permita a sua obtenção de forma nativa, com as modificações pós-traducionais necessárias à sua atividade. Uma alternativa é a expressão em sistema eucariótico LEXSY, baseado em *Leishmania tarentolae*, organismo não patogênico capaz de produzir e processar proteínas de outras leishmanias de maneira muito semelhante ao organismo original.

Objetivos

Este trabalho tem por foco o estudo da E-NTPDase2 de *L. infantum* através de sua expressão em *L. tarentolae*.

Material e Métodos

- A cepa P10 de *L. tarentolae* foi cultivada em meio BHI (Brain Heart Infusion) suplementado com Hemina e Penicilina-Estreptomicina (PenStrep).
- O teste de expressão foi conduzido a partir de um clone de *L. tarentolae* (P10_LiNTPDase2.7) obtido anteriormente, resultante de um processo de transfecção da célula selvagem (P10_WT) com o vetor pLEXSYneo2 contendo o gene da LiNTPDase2; as células do clone foram cultivadas em 400 mL de meio a 25°C e 140 rpm, variando o tempo de expressão em 72 horas e 1 semana. Após o tempo, as culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos e 4°C; usamos o sobrenadante de cultura para a purificação que foi feita via cromatografia de afinidade a níquel. Para analisar a expressão, as frações obtidas na purificação, bem como o extrato celular das células centrifugadas foram submetidos ao SDS-PAGE e posteriormente transferidas para membrana de nitrocelulose para realização do Western blot com anticorpo anti cauda de histidina.

- Realizamos novas transfecções via eletroporação. O vetor com gene de interesse foi novamente inserido no clone P10_LiNTPDase2.7, enquanto a cepa selvagem foi transfectada com água (controle negativo) e com o vetor vazio. Essas células foram colocadas em meio BHI suplementado, havendo adição do antibiótico de seleção (neomicina) no dia seguinte.

Resultados e Discussão

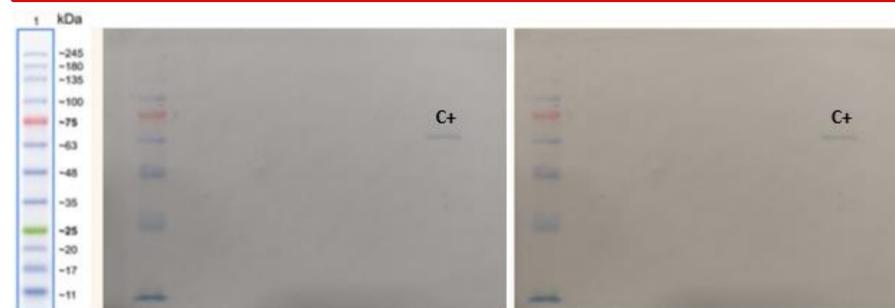


Figura 1. Resultado do Western blot para a expressão de 72 horas e 1 semana. Apenas o C+ (controle positivo) foi revelado.

- Não foi possível detectar a expressão da LiNTPDase2.
- As células transfectadas com o vetor vazio e com o vetor contendo o gene de interesse se mostraram muito viáveis, indicando que elas ainda têm potencial para receber mais DNA.

Conclusões

A expressão da LiNTPDase2 ainda precisa ser confirmada. Apesar disso, continuaremos com novas rodadas de transfecções, visando obter mutantes com maior número de cópias do genes de interesse, e que, conseqüentemente, terão maior capacidade de expressar a proteína.

Agradecimentos

