Simpósio de Integração Acadêmica
"Ciências Básicas para o Desenvolvimento Sustentável"
SIA UFV 2023

UFV
Universidade Federal de Viçosa

Desenvolvimento de uma plataforma de produção da glicoproteína fator VII de coagulação sanguínea por expressão heteróloga em *Leishmania tarentolae*

SCHITTINO, L. M. P.; MENDES, T. A. O.; SENRA, R. L.; KNOP, G. L.; FIUZA, J. A.

Fator VII, glicosilação, *L. tarentolae*

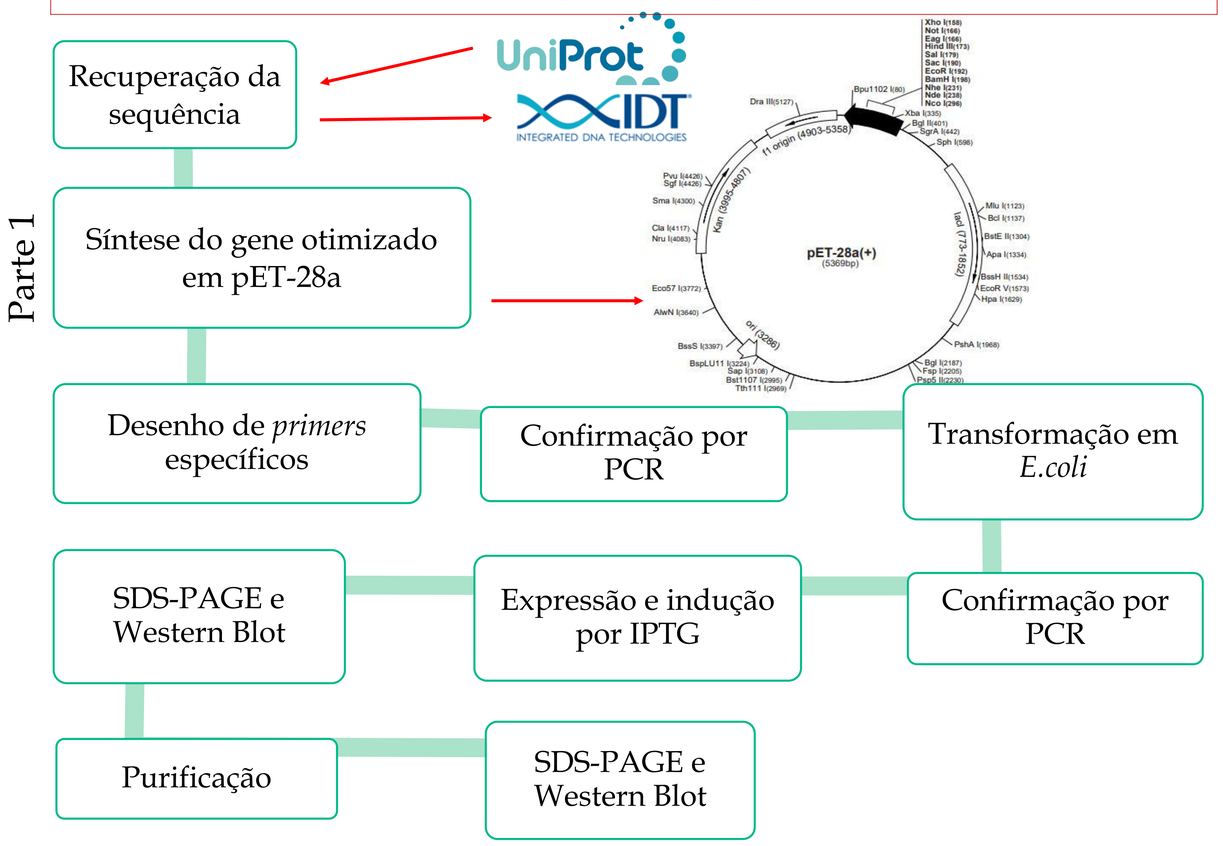
INTRODUÇÃO

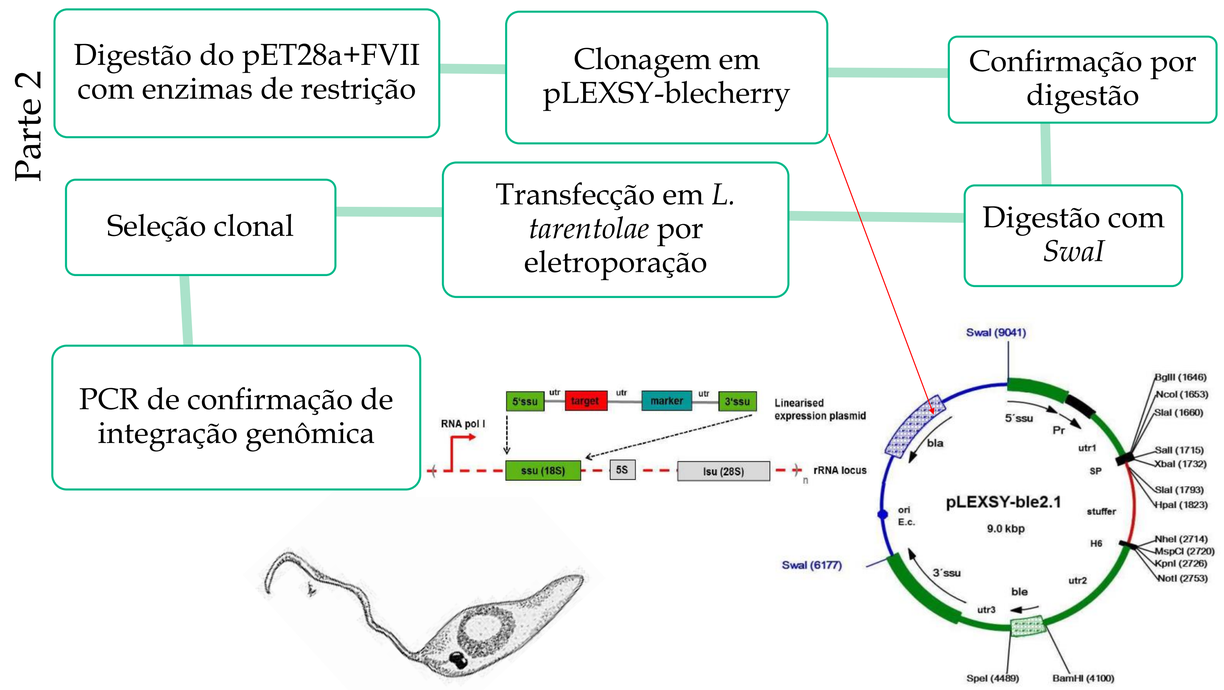
A glicoproteína Fator VII é precursora da cascata de coagulação sanguínea e sua ausência ou deficiência pode acarretar em hemofilia, que atinge milhares de brasileiros. A produção industrial de glicoproteínas é um mercado crescente e, de modo geral, influenciada pelas limitações que os organismos utilizados no processo apresentam. O Fator VII é produzido em células de mamíferos por conta da necessidade de glicosilação. Porém, esse sistema de expressão apresenta baixo rendimento e alto custo de produção. Por ser uma proteína poli-glicosilada, algumas de suas funções podem ser comprometidas quando produzida em organismos, como bactérias e leveduras, que não realizam glicosilação ou realizam de forma incompleta.

OBJETIVOS

O objetivo geral desse projeto é utilizar uma cepa de *Leishmania tarentolae*, um protozoário não patogênico, geneticamente otimizado para expressão da proteína com perfil de glicosilação semelhante ao de humanos, para produção de fator VII com padrão de glicosilação de mamíferos.

METODOLOGIA





RESULTADOS

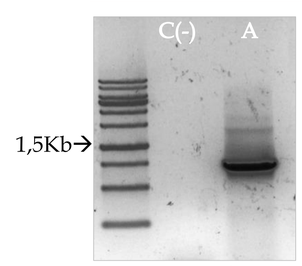


Fig.1: PCR confirmação da síntese FVII+pET28a.

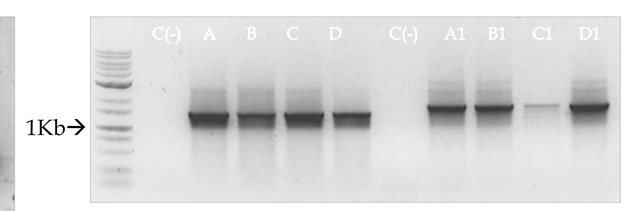


Fig.2: PCR de *E.coli* transformantes usando primers específicos e de vetor. A, B, C, D: colônias com primers específicos. A1, B1, C1, D1: colônias com primers do vetor.

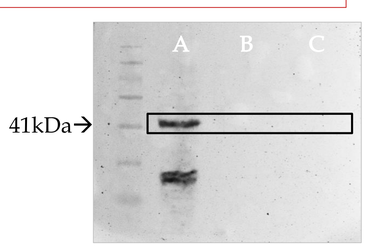


Fig.3: Western Blot teste de indução de expressão em *E.coli*. A: amostra induzida; B: amostra não induzida; C: *E.coli* selvagem.

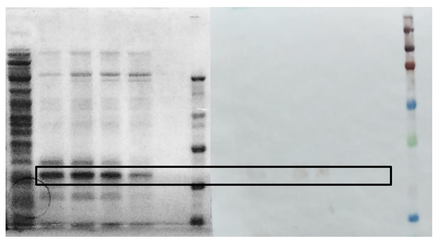


Fig.4: SDS-PAGE e Western Blot purificação em *E. coli*.

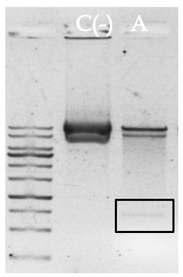


Fig.5: Confirmação da clonagem em pLEXSY-blecherry (liberação do inserto).

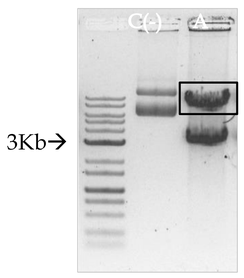


Fig.6: Linearização do vetor com *SwaI*.

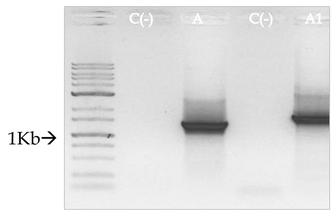


Fig.7: PCR de recombinação. A: primer específico. A1: primer endógeno.

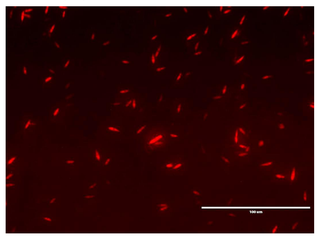


Fig.8: Validação da integração genômica por microscopia eletrônica de fluorescência.

CONCLUSÃO

Posteriores testes de expressão proteica em *Leishmania* devem ser procedidos, bem como testes de atividade biológica das amostras de FVII produzidas em *E. coli*, *L. tarentolae* wild type, *L. tarentolae* otimizada e FVII comercial para fins de comparação de massa molecular e funcionalidade adquirida pela adição do padrão de glicosilação.

AGRADECIMENTOS

CCB Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
LBSMSB
LBM
CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CAPES
FAPEMIG
Bill & Melinda Gates foundation