

RESUMO - MULTIDISCIPLINAR

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE ACETILCOLINESTERASE E BUTIRILCOLINESTERASE HUMANAS EM E. COLI

Manuela Goulart Araujo (manuela.goulart24@gmail.com)

Gabriel De Lima Leal (lealgabriellima13@gmail.com)

Renata Soares Da Fonseca (renatasoaresfonse@gmail.com)

Marcelo De Freitas Lima (mflima@ufrj.br)

A acetilcolinesterase (AChE) desempenha um papel importante na degradação da acetilcolina (ACh), um neurotransmissor fundamental na regulação da comunicação neuronal tanto do sistema nervoso central (SNC) quanto do periférico (SNP). Por outro lado, a butirilcolinesterase (BChE) está envolvida na desintoxicação e no metabolismo de lipídios no plasma sanguíneo. A hiperatividade da AChE leva à redução da concentração de ACh, promovendo a degeneração do sistema colinérgico e contribuindo para o desenvolvimento da doença de Alzheimer (DA). Essa disfunção demonstra a relevância dos inibidores de colinesterase no tratamento de distúrbios neurológicos, visto que a busca por novos compostos se faz necessária devido as limitações dos tratamentos atuais. O objetivo geral deste estudo foi a produção das enzimas hAChE e hBChE recombinantes em E. coli para futuros testes de inibição. Para isso, foram otimizados os parâmetros de expressão das colinesterases, tais como: a concentração do indutor (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo - IPTG), a variação da temperatura de incubação (18 °C e 37 °C), o tempo de indução e a composição do meio de cultivo Luria Bertani (LB). As sequências dos genes

humanos ACHE e BCHE foram otimizadas para expressão em *E. coli* e clonadas nos vetores pET26b(+) e pET28a(+). As construções foram transformadas nas linhagens de *E. coli* DH5a e BL21(DE3) para propagação e indução, respectivamente. A expressão das enzimas foi induzida com IPTG nas diferentes condições de temperatura e composição do meio de cultura. Além disso, a expressão das proteínas foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE). Os resultados indicaram que a expressão das enzimas foi bem sucedida com o vetor pET26b(+) a 18°C em determinadas composições do meio de cultura. A hAChE foi expressa no meio contendo NaCl 0,5%, triptona 0,5% e extrato de levedura 0,5%, enquanto a hBChE foi expressa nos meios contendo NaCl 0,5% ou 1%, peptona 0,5% e extrato de levedura 0,5%. No entanto, com o vetor pET28a(+) a 18°C, não foi observada a expressão da hBChE e a expressão da hAChE ainda não foi avaliada. Os vetores pET foram utilizados para expressão dos genes humanos ACHE e BCHE em *E. coli*, porém os resultados experimentais revelaram que os protocolos de expressão das colinesterases precisam passar por adaptações. Apesar de serem detectadas as proteínas recombinantes em SDS-PAGE, a quantidade está aquém do esperado para iniciar a etapa de purificação. Futuramente, serão realizadas modificações nas condições de cultivo para que sejam realizadas a purificação, a caracterização estrutural e os ensaios enzimáticos com e sem inibidores.

Palavras-chave: ache; bche; expressão heteróloga; biotecnologia.