B4. OBTENÇÃO DE ALFA-AMILASE PANCREÁTICA E MALTASE-GLICOAMILASE HUMANAS COM POTENCIAL PARA DESENVOLVIMENTO DE NOVOS AGENTES TERAPÊUTICOS PARA DIABETES.

Caroline de Souza Almeida de Avellar¹.

¹ Bio-Manguinhos / Fiocruz.

INTRODUÇÃO A Diabetes Mellitus tipo II é a doença mais comum dentre as desordens metabólicas crônicas, sendo atualmente a maior causa de morbidade e mortalidade, acometendo jovens, adultos e idosos. Representa um conjunto de síndromes patológicas que culminam em hiperglicemia decorrente da ingestão excessiva de carboidratos. A amilase salivar inicia a digestão do amido, prosseguindo no duodeno, por ação da amilase pancreática e α -glicosidases localizadas no intestino delgado, responsáveis por finalizar a digestão do amido. As principais α -glicosidases intestinais são a Sucrase-isomaltase e a Maltase-glicoamilase, que hidrolisam as ligações glicosídicas α -1,4 das dextrinas, liberando glicose. A Sucrase-isomaltase é mais abundante do que a Maltase-glicoamilase, porém esta última possui maior atividade catalítica. Inibidores da α -amilase pancreática e das glicosidases intestinais, como a acarbose, têm sido empregados no tratamento da Diabetes tipo II. Inibidores de glicosidase contendo o núcleo 1,2,3-triazol, um heterociclo nitrogenado de origem sintética, tem servido de base para o desenho de diversos fármacos. Por estarem envolvidas em uma grande variedade de eventos biológicos, as glicosidases recombinantes são importantes produtos biotecnológicos empregados como alvo de uma série de compostos com potencial terapêutico para o tratamento de doenças como a Diabetes tipo II.

OBJETIVO Obter as glicosidases humanas recombinantes Alfa-amilase pancreática e Maltase-glicoamilase através de sistemas de expressão por Baculovírus geneticamente modificados e células de inseto Sf9 de *Spodoptera frugiperda* com potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

METODOLOGIA Plasmídeos de clonagem recombinantes foram selecionados em *Escherichia coli* One Shot Mach T1 e transformados para *Escherichia coli* DH10Bac, dando origem a bacmídeos recombinantes. Foram utilizados vetores de clonagem pFastBac/HBM-TOPO, que possuem sequência Histag C-terminal e apresentam

sinal de secreção da proteína para o meio extra celular. Bacmídeos recombinantes foram transfectados em células de inseto da linhagem Sf9 e as glicosidases obtidas foram identificadas e caracterizadas por eletroforese SDS-PAGE e ensaio imunoenzimático.

RESULTADOS O processo de padronização das concentrações de anticorpos policlonais foi realizado para dar prosseguimento à realização dos géis em Poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western Blot*. As secreções da Alfa-amilase e Maltase-glicoamilase foram obtidas em cultivos de células Sf9, com inóculo inicial de $2,0 \times 10^5$ células viáveis/mL, infectadas por Baculovírus geneticamente modificados e analisadas por *Western Blot*, através da visualização de banda protéica correspondente à massa molar do controle positivo obtido por indução em *E. coli*.

CONCLUSÃO A partir da obtenção das glicosidases por expressão heteróloga, foi confirmada a secreção das glicosidases Alfa-amilase e Maltase-glicoamilase em células de inseto Sf9 infectadas por Baculovírus geneticamente modificados. Desta forma, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para Diabetes Mellitus Tipo II tendo como alvo estas enzimas torna-se possível.

PALAVRAS-CHAVE alfa-amilase pancreática, maltaseglicoamilase, Diabetes Mellitus, Sf9, baculovírus.