

Modelo de Texto para Trabalho - máximo 1300 palavras

Tema: Produção de compostos de interesse em leveduras usando biologia sintética

Assunto escolhido: síntese de artemisina

Alunas: Aline Maria da Silva e Regina Lúcia Baldini

Introdução

Muitas das moléculas com propriedades farmacológicas são derivadas de produtos naturais, resultantes de vias de metabolismo secundário de plantas ou microrganismos. Esses metabólitos secundários podem ser extraídos diretamente do organismo produtor, o que pode requerer grandes quantidades deste, já que os compostos de interesse frequentemente correspondem a uma parcela muito pequena da biomassa dos organismos produtores, demandando métodos de purificação trabalhosos e de baixo rendimento. Devido a complexidade estrutural dessas moléculas, sua síntese química pode ser complicada ou muito custosa, inviabilizando sua produção em escala industrial. A síntese enzimática *in vitro* também é complicada, pois seriam necessárias várias enzimas para que todas as etapas do processo pudessem ser efetuadas na indústria.

Assim, uma alternativa interessante é a transferência da via biosintética do composto de interesse do organismo de origem para um modelo mais amigável, que pode produzir o composto em quantidades relativamente maiores, com melhor rendimento, e usando métodos de extração mais simples.

Descrição do Problema

A malária é uma doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e de ocorrência maior em países em desenvolvimento, sendo que 219 milhões de casos foram reportados entre 2000 e 2010, com 666 mil mortes em 2010. Os parasitas desenvolveram resistência a aos fármacos comumente utilizados (cloroquina e a sulfadoxina-pirimetamina), levando à necessidade de se desenvolver novas alternativas. Uma droga eficiente é a artemisina, usada tradicionalmente na medicina chinesa e obtida da planta *Artemisia annua*. A artemisina é derivada de compostos terpenóides e sua síntese na planta depende de vários passos que vão desde o precursor acetil-coenzima A até o produto final. Entretanto, a obtenção do composto em quantidades que viabilizassem seu uso de maneira previsível e econômica levou a um financiamento pela Fundação Bill e Melinda Gates. O objetivo deste projeto foi a obtenção de artemisina através de microrganismos que contivessem os genes responsáveis pela síntese de ácido artemísico, que seria convertido em artemisina num último passo envolvendo uma reação orgânica. Este tipo de abordagem é um exemplo de Biologia Sintética, onde um organismo "hospedeiro" recebe todos os genes necessários para que a via biosintética de um determinado composto. Esses genes devem ser expressos de forma eficiente e seus produtos devem ser funcionais no hospedeiro, tendo como resultado final o composto de interesse.

Ferramentas e conteúdos de Biologia Molecular necessários para a resolução do problema

Para que a artemisina pudesse ser obtida eficientemente por via da Biologia Sintética, o primeiro passo é conhecer sua via de síntese e os genes que codificam as enzimas envolvidas. No exemplo da artemisina, os conceitos de gene e sua detecção no genoma da planta são essenciais para que se possa avançar. Como os genes seriam introduzidos em microrganismos, seria interessante que estes genes sintéticos já estivessem livres de íntrons para sua expressão correta em bactérias – ou mesmo na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cuja frequência de genes próprios com íntrons é pequena. Portanto, seria necessário identificar os íntrons e não incluí-los nos genes transferidos para o hospedeiro, ou partir de cDNA obtido pela transcrição reversa de mRNAs maduros. Nas clonagens, é necessário ter conhecimento da estrutura e replicação do DNA, para que se possam desenhar iniciadores de PCR adequados, resultando nos fragmentos com as sequências desejadas. Outra alternativa seria realizar a síntese química das moléculas de DNA, o que seria desejável caso os conteúdos de G+C da planta fossem muito diferentes do hospedeiro, por exemplo.

Não basta apenas que as regiões codificadoras dos genes estejam presentes: eles devem ser expressos de maneira eficiente no organismo hospedeiro. Portanto, é necessário conhecer promotores e regiões regulatórias do hospedeiro que possam dirigir a expressão dos genes recombinantes. Os vetores em que estes genes serão incluídos devem permitir sua transferência e manutenção no hospedeiro. Vias de transferência de material genético devem ser empregadas, podendo ser por transformação induzida por métodos que tornem os hospedeiros competentes para receber o DNA exógeno. A integração do material genético em um cromossomo do hospedeiro pode garantir que este não seja perdido ao longo das gerações, o que poderia acontecer no caso de se utilizar plasmídeos. A manutenção de plasmídeos com antibióticos, por exemplo, seria custosa na indústria e poderia causar danos ambientais se estes não fossem corretamente descartados ao final do processo. Para que a integração funcione, é necessário entender as vias de recombinação do hospedeiro que podem ser usadas, ou, caso isso não seja possível, outros métodos devem ser empregados, envolvendo a transferência de genes provenientes de outros sistemas que permitam que a integração ocorra.

Também é necessário que o hospedeiro seja capaz de sintetizar eficientemente os polipeptídeos que darão origem às enzimas da via biosintética. O uso de códons do material genético recebido deve ser semelhante ao do hospedeiro, assegurando-se que a tradução ocorra sem paradas devido à presença de códons que sejam reconhecidos por tRNAs raros no hospedeiro.

Referências

Paddon and Keasling. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nature Reviews*, 12: 355-367, 2014.

Paddon et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 496: 528-532, 2014.