MARINA VIEIRA DE CARVALHO

# Produção de leptina recombinante bovina em leveduras *Pichia pastoris* e avaliação da atividade biológica

**Pirassununga**

**2014**

MARINA VIEIRA DE CARVALHO

# Produção de leptina recombinante bovina em leveduras *Pichia pastoris* e avaliação da atividade biológica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

**Departamento:**
Produção e Nutrição Animal

**Área de Concentração:**
Produção e Nutrição Animal

**Orientador:**
Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva

**Pirassununga**

**2014**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO**

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2937
FMVZ

Carvalho, Marina Vieira de
Produção de leptina recombinante bovina em leveduras *Pichia pastoris* e avaliação da atividade biológica / Marina Vieira de Carvalho. -- 2014.
109 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva.

1. Leptina Recombinante. 2. Expressão gênica. 3. ELISA. 4. *Pichia pastoris*. 5. Bovino. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

# CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Produção de leptina recombinante bovina em leveduras *Pichia pastoris* e avaliação da atividade biológica", protocolado sob o nº 3021/2013, utilizando amostras de tecido adiposo de novilhas Nelore, sob a responsabilidade Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, foi aprovado em reunião de 13/11/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Production of bovine recombinant leptin in Pichia pastoris yeast and evaluation of the biological activity", protocol number 3021/2013, utilizing adipose tissue samples from heifers, under the responsibility Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, was approved in the meeting of day 11/13/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 18 de novembro de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

**FOLHA DE AVALIAÇÃO**

Nome: CARVALHO, Marina Vieira de
Titulo: Produção de leptina recombinante bovina em leveduras *Pichia pastoris* e avaliação da atividade biológica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do titulo de Doutor em Ciências

**Data:___/___/____**

**Banca Examinadora**

Prof. Dr.: _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr.: _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr.: _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr.: _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr.: _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr.: _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

À minha mãe Marcia de Castro Sebastião, a pessoa mais importante da minha vida e à quem devo tudo que sou, pelo carinho, dedicação e amor. Por me ensinar a ser uma pessoa forte e nunca fugir diante das adversidades. Por ensinar que a felicidade depende, antes de tudo, de nós mesmos;

À minha avó Maria (Vó Maria), que em minha vida torceu e rezou por mim em cada novo desafio e conquista, fossem elas pequenas ou grandes;

Ao meu avô Mário, que apesar de não estar mais conosco, tenho certeza que olha por mim;

Ao meu noivo Eduardo Scheffer, por todo o amor e dedicação, sempre cuidando de mim e nunca me deixando desistir e sempre me mostrando o lado bom da vida;

À toda a minha família por sempre me apoiarem e incentivarem;

Aos grandes amigos Edgar Pavão, José Antônio Cuel e José Roberto Balduíno, sempre dispostos a me ajudar no que fosse preciso, apoiando, ouvindo e aconselhando nas horas difíceis;

*Dedico este trabalho com imensa gratidão*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por tornar tudo possível;

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal pela oportunidade da realização deste curso;

À Universidade Federal de São Carlos e ao Departamento de Genética e Evolução, por permitir a realização dos experimentos em suas instalações;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudo, que gerou tranqüilidade e possibilitou a dedicação intensa e exclusiva a este trabalho;

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, pela oportunidade de aprendizado e por provocar o desejo de superação profissional;

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Silva, da UFSCar, pela boa vontade, conselhos, sugestões e ensinamentos na hora de maior necessidade, e por abrir as portas de seu laboratório, sem restrições, quando mais precisei;

À doutoranda Adelita Carolina Santiago, que me ensinou muito, pela boa vontade, disposição e prontidão em acompanhar cada passo desse experimento;

À Doutora Lígia Garcia Mesquita, amiga querida, pelo apoio, ajuda e paciência no laboratório, pelas muitas conversas e horas de descontração;

À colega de pós-graduação Bárbara Marques, sempre alegre, pelo companheirismo e palavras de apoio;

Aos colegas Rafael Teixeira, companheiro de doutorado, e Edimarco Pansani, aluno de Iniciação Científica, pelo companheirismo e pelas muitas risadas no laboratório de genômica funcional;

À todos os colegas de pós graduação e estagiários que me auxiliaram na realização deste trabalho.

## RESUMO

CARVALHO, M. V. **Produção de leptina recombinante bovina em leveduras *Pichia* pastoris e avaliação da atividade biológica.** [Production of recombinant bovine leptin in *Pichia pastoris* yeasts and evaluation of the biological activity]. 2014. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

No experimento 1, avaliou-se os efeitos da leptina exógena na concentração sérica de leptina e na expressão do gene *LEP* no tecido adiposo de novilhas zebuínas pré-púberes. Amostras de tecido adiposo (mesentérico, perirenal e subcutâneo) e de sangue foram obtidas de 36 novilhas, distribuídas nos tratamentos: A) dieta de alta energia; B) dieta de baixa energia; BL) dieta de baixa energia + 4,8 µg/kg PV de oLeptin subcutânea, duas vezes ao dia, por 56 dias. A concentração de leptina foi determinada com kit comercial ELISA (Cusabio) específico. Amostras de sangue de quatro novilhas por grupo foram coletadas em seis pontos no tempo, sendo um antes e um após o tratamento hormonal. Dois dias após a obtenção da puberdade, oito novilhas por grupo foram abatidas para coleta de tecido. A expressão gênica foi quantificada nos depósitos de gordura por PCR em tempo real. A oLeptina aumentou transitoriamente a concentração de leptina do grupo BL, com pico (11,1 ± 1,4 ng/mL) após 7 dias do início do tratamento. A leptina sérica do grupo A aumentou linearmente no tempo, enquanto no grupo B, manteve-se constante (4,0 ± 2,0 ng/mL). A dieta A aumentou a expressão de leptina no tecido adiposo em 2,4 vezes; e a administração de oLeptina diminuiu a expressão do gene *LEP* em cerca de 2,5 vezes, comparando com o grupo controle. A redução na expressão do gene *LEP* explica a redução na leptina sérica do grupo BL após 30 dias de tratamento hormonal. O objetivo do experimento 2 foi clonar a região codificadora da leptina bovina, transformar leveduras *Pichia pastoris* KM71H e expressar a proteína no meio de cultura. O gene da leptina foi amplificado em reação de PCR, a partir de amostra de tecido adiposo subcutâneo de novilha do grupo A. Os *primers* 5' – ATT**GAATTC**GTGCCCATCTGCAAGGTC – 3' (senso) e 5' – ATT**GTCGAC**GCACCCGGGACTGAGGT – 3' (antisenso), contendo sítios *Eco*RI e *Sal*I, foram desenhados com base na sequência do mRNA da leptina bovina (NM 173928.2), substituindo a sequência sinal de secreção nativa pela sequência do Fator α do *Saccharomyces cereviasiae.* O inserto foi clonado nos vetores de expressão pPICZαA e pGAPZαA (Invitrogen), sendo as leveduras transformadas por eletroporação. Clones com múltiplas cópias do gene foram selecionados em meio YPD + 500 µg/mL de zeocina, e 22 colônias

recombinantes foram selecionadas para análise de expressão em pequena escala. Colônias pPICbLep foram inicialmente cultivadas em meio de crescimento (BMGY), sendo transferidas para meio de indução (BMMY), contendo metanol. A indução durou 144 horas. Alíquotas de 200 µl de sobrenadante foram coletadas diariamente, para análise da presença da bLeptina por SDS-PAGE. As colônias pGAPbLep foram cultivadas em meio YPD por 96 h, com coleta de sobrenadante a cada 24 h. As leveduras foram transformadas com sucesso, com os plasmídeos pPICbLep e pGAPbLep, entretanto, apenas as colônias pGAPbLep expressaram uma proteína de 35 kDa, o dobro do tamanho esperado para a bLeptina (17 kDa), provavelmente por ocorrência de dimerização. Mais estudos são necessários sobre os processos de produção de leptina recombinante bovina em *Pichia pastoris.*

Palavras-chave: Leptina Recombinante. Expressão gênica. ELISA. *Pichia pastoris*. Bovino.

## ABSTRACT

CARVALHO, M. V. **Production of recombinant bovine leptin in *Pichia pastoris* yeasts and evaluation of the biological activity.** [Produção de leptina recombinante bovina em leveduras *Pichia* pastoris e avaliação da atividade biológica]. 2014. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

In experiment 1, the effects of exogenous leptin were evaluated on serum leptin levels and on *LEP* gene expression in the adipose tissue of prepubertal zebu heifers. Adipose tissue (mesenteric, perirenal and subcutaneous) and blood samples were collected from 36 heifers, distributed among treatments: A) high energy diet; B) low energy diet; BL) low energy diet + 4,8 µg/kg BW subcutaneous oLeptin, twice daily, for 56 days. Leptin concentration was determined with specific commercial ELISA kit (Cusabio). Blood from four heifer per group was sampled in six time points, one before and one after the hormonal treatment. Two days after puberty attainment , eight heifers per group were slaughter for tissue sampling. Gene expression was quantified in fat depots by real time PCR. The oLeptin increased transiently leptin concentration in group BL, with a peak (11,1 ± 1,4 ng/mL) after 7 days of treatment. Serum leptin in group A increased linearly in time, while in group B it remained constant (4,0 ± 2,0 ng/mL). Diet A enhanced leptin expression in the adipose tissue 2.4-fold, and oLeptin administration decreased de expression 2.5-fold, comparing to the control group. The decrease in *LEP* gene expression explains the reduction in serum leptin from group BL after 30 d of hormonal treatment. The objective with experiment 2 was to clone de codifying region of bovine leptin, transform KM71H *Pichia pastoris* yeasts, and express the protein in culture media. The leptin gene was amplified by PCR, from subcutaneous adipose tissue sample from a heifer in group A. Primers 5' – ATT**GAATTC**GTGCCCATCTGCAAGGTC – 3' (forward) and 5' – ATT**GTCGAC**GCACCCGGGACTGAGGT – 3' (reverse), containing *Eco*RI and *Sal*I restriction sites, were designed based in the mRNA sequence from bovine leptin (NM 173928.2), replacing the native secretion signal sequence by the α-factor sequence from *Saccharomyces cereviasiae.* The insert was cloned in the expression vectors pPICZαA and pGAPZαA (Invitrogen), and yeasts were transformed by electroporation. Clones with multiple copies of the gene were selected in YPD + 500 µg/mL zeocina, and 22 recombinant colonies were selected for a small-scale expression analysis. pPICbLep colonies were initially cultivated in growth media (BMGY), and then transferred to the induction media (BMMY), containing methanol. The colonies were inducted for 144 h. Supernatant aliquots (200 µl)

were collected daily, for bLeptin analysis in SDS-PAGE. pGAPbLep colonies were cultivated in YPD media for 96 h, collecting supernatant samples each 24 h. Yeasts were successfully transformed with the plasmids pPICbLep and pGAPbLep, however, only pGAPbLep colonies expressed a protein with 35 kDa, twice the size expected for the bovine leptin (17 kDa), probably because of dimerization. More studies are necessary about the recombinant bovine leptin production processes in *Pichia pastoris*.

Keywords: Recombinant Leptin. Gene expression. ELISA. *Pichia pastoris*. Bovine.

## LISTA DE TABELAS

Quadro 1- Nome, sequência e fabricante dos *primers*..... 50

## LISTA DE FIGURA


Figura 1- Regressão do diâmetro máximo do folículo dominante em função do tempo, durante o período de aplicação de leptina (56 dias)..... 31

Figura 2- Diagrama estrutural da molécula de leptina..... 33

Figura 3- Alinhamento das sequências de aminoácidos da leptina humana (H-ob), de gorila (G-ob), de chimpanzé (Ch-ob), de orangotango (O-ob), de macaco Rhesus (Rh-ob), de cachorro (D-ob), de bovinos (B-ob), de suínos (P-ob), de ratos (R-ob) e de camundongos (M-ob)..... 34

Figura 4- Organização molecular do gene da leptina..... 35

Figura 5- Via do metanol em *Pichia pastoris*..... 42

Figura 6- A) Mapa do vetor de propagação pTZ57R/T; B) Sequência do sítio de clonagem múltipla (MCS)..... 54-55

Figura 7- A) Mapa do vetor de expressão pPICZαA; B) Sequência do sítio de clonagem (região MCS) do pPICZαA, com a localização dos sítios de restrição *Eco*RI e *Sal*I em destaque..... 59-60

Figura 8- A) Mapa do vetor de expressão pGAPZαA; B) Sequência do sítio de clonagem (região MCS) do pGAPZαA, com a localização dos sítios de restrição *Eco*RI e *Sal*I em destaque..... 61-62

Figura 9- Análise de regressão da concentração sérica de leptina no tempo, do início do tratamento nutricional (dia 0) até 11 dias após o final da aplicação subcutânea de oLeptina ( dia 80)..... 72

Figura 10- Efeito de dieta e da leptina ovina exógena (oLeptina) na expressão do gene *LEP*..... 75

Figura 11- Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose a 1%..... 78

Figura 12- Bactérias *E.coli* DH5α transformadas com o plasmídeo pTZlep, em meio LB Agar com ampicilina (100 µg/mL)..... 78

.

Figura 13- Eletroforese em gel de agarose 1% corada com brometo de etídeo, mostrando a clivagem do plasmídeo pTZlep com as enzimas *Eco*RI e *Sal*I..... 79

Figura 14- Bactérias *E.coli* DH5α transformadas com os plasmídeos pGAPbLep (A) e pPICbLep (B) em meio LB agar com zeocina (25 µg/mL)..... 80

Figura 15- Eletroforese em gel de agarose 1% corada com brometo de etídeo, mostrando a PCR de colônia de bactérias *E. coli* DH5α transformadas com os plasmídeos pPICbLep (em cima) e pGAPbLep (embaixo)..... 81

Figura 16- Sequenciamento do inserto contendo o gene da leptina bovina, utilizando os *primers* fator α e AOX 3'..... 82

Figura 17- Eletroforese em gel de agarose 1% corada com brometo de etídeo, mostrando os plasmídeos pPICbLep e pGAPbLep linearizados com as enzimas *Pme*I e *Xma*JI, respectivamente..... 83

Figura 18- Leveduras *Pichia pastoris* KM71H transformadas com os plasmídeos pPICbLep (A e C) e pGAPbLep (B e D)..... 85

Figura 19- Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, mostrando a PCR de colônia de leveduras *Pichia pastoris* cepa KM71H transformadas com os plasmídeos pPICbLep (em cima) e pGAPbLep (embaixo)..... 86

Figura 20- Análise em SDS-PAGE 15% da expressão em pequena escala de bLeptina em transformantes de *Pichia pastoris* (pGAPbLep)..... 88

## LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

| | |
|---|---|
| °C | Graus Celsius |
| AOX | Álcool oxidase |
| *AOX1* | Gene codificador da enzimal álcool oxidase 1 |
| *AOX2* | Gene codificador da enzima álcool oxidase 2 |
| Asn | Asparagina |
| bLeptina | Leptina recombinante bovina |
| $CaCl_2$ | Cloreto de cálcio |
| cDNA | DNA complementar |
| CL | Corpo lúteo |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| DHAS | Diidroxiacetona sintase |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| dNTP | Desoxirribonucleotídeos trifosfatos |
| DO | Densidade óptica |
| DTT | Ditiotreitol |
| ECC | Escore de condição corporal |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| FLD | Formaldeído desidrogenase |
| FMDH | Formato desidrogenase |
| g | Gramas |
| *g* | Gravidade |
| GABA | Ácido gama-aminobutírico |
| *GAP* | Gene codificador da enzima GAPDH |
| GAPDH | Glicerol-3-fosfato dehidrogenase |
| GMD | Ganho médio diário |
| GnRH | Hormônio liberador de gonadotrofinas |
| HEPES | Ácido 2-[4-(2-hidroxietil) 1-piperazinil] etanosulfônico |
| IGF-I | Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I |
| IL | Interleucina |
| IPP | Idade ao primeiro parto |
| IPTG | Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo |

| | |
|---|---|
| JAK | Janus-quinase |
| kb | Quilobases |
| kDa | Quiolodaltons |
| kg | Quilograma |
| kV | Quilovolts |
| L | Litros |
| LB | Luria-Bertani |
| *LEP* | Gene da leptina |
| LH | Hormônio luteinizante |
| M | Molar |
| MCS | Sítio de clonagem múltipla |
| $MgCl_2$ | Cloreto de magnésio |
| mL | Mililitros |
| mM | Milimolar |
| mRNA | RNA mensageiro |
| NaOAc | Acetato de sódio |
| ng | Nanogramas |
| NPY | Neuropeptídeo Y |
| OB-R | Receptor de leptina |
| oLeptina | Leptina recombinante ovina |
| $P_{AOX1}$ | Promotor do gene *AOX1* |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reação em cadeia de polimerase |
| $P_{GAP}$ | Promotor do gene *GAP* |
| pH | Potencial de hidrogênio |
| POMC | Pró-opiomelanocortina |
| PV | Peso vivo |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RPL19 | Proteína ribossomal L19 |
| rpm | Rotações por minuto |
| rRNA | RNA ribossômico |
| RT | Transcriptase reversa |
| RT-PCR | PCR em tempo real |

| | |
|---|---|
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio |
| Ser | Serina |
| STAT | Transdutores de sinal e ativadores de transcrição |
| TAE | Tampão Tris-acetato-EDTA |
| TE | Tampão Tris-EDTA |
| Thr | Treonina |
| U | Unidade enzimática |
| UV | Ultravioleta |
| X-gal | 5-bromo-4-cloro-indolil-β-D-galactopiranosídeo |
| YEPD | Meio dextrose, peptona e extrato de levedura |
| YEPDS | Meio sorbitol, dextrose, peptona e extrato de levedura |
| µF | Microfaraday |
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitros |
| µM | Micromolar |
| Ω | ohm |

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO**..... 22

**2 HIPÓTESE E OBJETIVOS**……..…….... 25
2.1 HIPÓTESES..... 25
2.1.1 Experimento 1..... 25
2.1.2 Experimento 2..... 25
2.2 OBJETIVOS..... 25
2.2.1 Experimento 1..... 25
2.2.2. Experimento 2..... 26

**3 REVISÃO DE LITERATURA**..... 27
3.1 PECUÁRIA DE CORTE E PUBERDADE DE NOVILHAS..... 27
3.2 LEPTINA..... 29
3.2.1 Relação entre leptina e puberdade..... 29
3.2.2 Estrutura molecular da leptina..... 32
3.2.3 Gene da leptina..... 34
3.2.4 Mecanismo de ação da leptina..... 35
3.3 EXPRESSÃO DE LEPTINA RECOMBINANTE EM SISTEMAS HETERÓLOGOS..... 38
3.4 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM *PICHIA PASTORIS*..... 39
3.4.1 Metabolismo do metanol..... 41
3.4.2 Promotor do gene *AOX1*..... 42
3.4.3 Promotor do gene *GAP*..... 43
3.4.4 Glicosilação..... 44

**4 MATERIAL E MÉTODOS**..... 46
4.1 LOCAIS..... 46
4.2 EXPERIMENTO 1..... 46

4.2.1 Animais e tratamentos..... 46
4.2.2 Dosagem da concentração de leptina sérica..... 47
4.2.3 Extração do RNA total do tecido adiposo..... 48
4.2.4 Síntese de cDNA..... 49
4.2.5 Análise de PCR em tempo real (RT-PCR)..... 49
4.2.6. Análise estatística..... 51
4.3 EXPERIMENTO 2..... 52
4.3.1 Amplificação do cDNA codificador da leptina bovina..... 52
4.3.2 Clonagem no vetor de propagação pTZ57R/T e transformação de bactérias *E. coli*..... 53
*4.3.2.1 Ligação*..... 54
*4.3.2.2 Preparação de bactérias quimiocompetentes*..... 55
*4.3.2.3 Transformação*..... 56
*4.3.2.4 Análise de restrição*..... 56
4.3.3 Clivagem do plasmídeo pTZlep e dos vetores de expressão pPICZαA e pGAPZαA..... 57
4.3.4 Clonagem nos vetores de expressão pPICZαA e pGAPZαA e transformação de bactérias *E. coli*..... 58
*4.3.4.1 Ligação*..... 58
*4.3.4.2 Transformação*..... 62
*4.3.4.3 PCR de colônia*..... 63
*4.3.4.4 Análise de restrição*..... 63
4.3.5 Sequenciamento do fragmento contendo o gene de interesse..... 64
4.3.6 Transformação das leveduras *Pichia pastoris* com os plasmídeos pPICbLep e pGAPbLep..... 64
*4.3.6.1 Linearização dos plasmídeos*..... 65
*4.3.6.2 Preparo da* Pichia *eletrocompetente*..... 65
*4.3.6.3 Transformação*..... 67
*4.3.6.4 PCR de colônia*..... 68
4.3.7 Avaliação da expressão da leptina bovina recombinante em pequena escala..... 69
*4.3.7.1 pPICbLep*..... 69
*4.3.7.2 pGAPbLep*..... 69

**5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....** 71
5.1 EXPERIMENTO 1..... 71
5.1.1 Concentração sérica de leptina..... 71
5.1.2 Expressão do gene *LEP* no tecido adiposo..... 74
**5.2 Experimento 2.....** 76
5.2.1 Amplificação e clonagem..... 77
5.2.2 Expressão de leptina recombinante bovina em pequena escala..... 86

**6 CONCLUSÕES.....** 93
6.1 IMPLICAÇÕES..... 93

**REFERÊNCIAS .....** 94

# 1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte responde por cerca de 10% da produção agropecuária total brasileira (CENSO AGROPECUÁRIO, 2006, IBGE). Além de possuir o segundo maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com cerca de 171,6 milhões de cabeças em 2006 (CENSO AGROPECUÁRIO 2006, IBGE), o Brasil ainda é considerado o maior exportador mundial de carne bovina (1,23 milhões de toneladas em 2006).

Hoje, a raça Nelore (*Bos taurus indicus*) é a mais difundida no Brasil, apresentando grande importância no crescimento da pecuária de corte nacional. Porém, apesar de adaptado às condições tropicais, o Nelore é considerado sexualmente tardio, alcançando a puberdade com idade mais avançada que raças européias (*Bos taurus taurus*), mesmo quando criados em condições semelhantes (THALLMAN et al., 1999; RODRIGUES et al., 2002).

A reprodução é um dos principais fatores determinantes da lucratividade e limitantes do desempenho da atividade pecuária (OLIVEIRA et al., 2003; SILVA, 2005), sendo que o início da atividade reprodutiva de fêmeas de corte influencia diretamente a rentabilidade da criação de bezerros, além de ser um dos principais responsáveis pela baixa taxa de desfrute do rebanho brasileiro. A idade ao primeiro parto depende diretamente da idade à puberdade, a qual, por sua vez, sofre influência de diversos fatores externos, como nutrição e fotoperíodo, por exemplo. O conhecimento das relações entre nutrição e reprodução é fundamental na tomada de decisões, quando se pretende aumentar a eficiência produtiva de um rebanho, permitindo traçar estratégias para otimizar programas de melhoramento genético.

Vários fatores indicam que a leptina seja o elo entre nutrição e reprodução. A concentração sangüínea de leptina em bovinos jovens é positivamente correlacionada com a quantidade das reservas corporais de energia (tecido adiposo) (EHRHARDT et al., 2000) e com a ingestão de calorias (BLACHE et al., 2000); a leptina sérica aumenta naturalmente conforme a puberdade se aproxima, em diversas espécies (DIAZ-TORGA et al., 2001; GARCIA et al., 2002); a presença de leptina é um requerimento essencial para a obtenção da puberdade em humanos (CUNNINGHAM et al., 1999). Além disso, observa-se que a administração de leptina exógena é capaz de induzir a puberdade em roedores e resgatar camundongos geneticamente obesos da esterilidade (CHEHAB et al., 1997; MOUNZIH et al., 1997).

A elucidação do mecanismo regulador da precocidade sexual, assim como da participação da leptina no controle da puberdade de novilhas zebuínas, é imprescindível para

o desenvolvimento de protocolos terapêuticos de indução da puberdade e de fármacos que aumentem a eficiência do sistema produtivo, assim como para programas de seleção genética mais eficazes na criação de linhagens de bovinos zebuínos sexualmente precoces.

A grande maioria dos estudos sobre os efeitos da leptina são realizados em roedores e humanos, e seu efeito no metabolismo, comportamento alimentar e reprodução de animais de produção ainda não foi adequadamente investigado (MÁČAJOVÁ et al., 2004). Os trabalhos sobre a participação da leptina nos processos fisiológicos da reprodução de bovinos ainda são relativamente escassos e controversos.

Devido ao custo excessivamente elevado (USD$1000/mg), e à existência de somente um fornecedor mundial (Protein Laboratories Rehovolt, Israel), a utilização de leptina recombinante ovina ou bovina para experimentos *in vivo* com animais de grande porte é atualmente inviável. Desta forma, a clonagem da região codificadora da leptina bovina e a subseqüente produção em larga escala da proteína recombinante forneceria o material necessário para o estudo do papel deste hormônio no crescimento e nas funções reprodutivas destes animais.

A *Escherichia coli* é o organismo mais utilizado para a expressão de proteínas heterólogas, sendo que diversos trabalhos na literatura descrevem a expressão de leptina nessa espécie. Entretanto, por se tratar de um organismo procarioto, a *E. coli* não realiza as modificações pós-traducionais observadas nos mamíferos, como formação de pontes dissulfeto, além de que a produção da proteína heteróloga ocorre principalmente por formação de corpos de inclusão, necessitando de trabalhosos métodos de purificação, que acabam por reduzir a atividade biológica da molécula (GERTLER et al., 1998).

Por outro lado, as leveduras, sendo organismos eucariotos, realizam as modificações pós-traducionais de forma semelhante aos mamíferos, além de permitir o direcionamento da proteína heteróloga para a via de secreção da célula, facilitando muito o processo de purificação e aumentando o rendimento de moléculas biologicamente ativas (GELLISSEN, 2000; CEREGHINO; CREGG, 2000). Ao mesmo tempo, a *Pichia pastoris* permite que as proteínas heterólogas sejam expressas na presença de um indutor (normalmente o metanol), garantindo um controle mais fino sobre a expressão; ou que sejam expressas de forma constitutiva, facilitando e simplificando os procedimentos de produção. Várias proteínas vêm sendo expressas com sucesso em sistemas baseados em *Pichia pastoris*, entretanto, praticamente não há trabalhos publicados sobre a expressão de leptina nesses organismos.

Assim, a *Pichia* representa um sistema de grande interesse para a produção de leptina em larga escala, visando o estudo *in vivo* de seus efeitos em animais de grande porte, mas uma

vez que as modificações pós-traducionais realizadas dependem intimamente da proteína que está sendo produzida, os sistemas de expressão baseados em *Pichia pastoris* merecem ser mais bem estudados e caracterizados para essa molécula em particular.

# 2 HIPÓTESES E OBJETIVOS

## 2.1 HIPÓTESES

### 2.1.1 Experimento 1

A administração de 4,8 µg/kg PV de leptina recombinante ovina exógena eleva a concentração plasmática de leptina para valores acima de 5 ng/mL por cerca de 8 a 12 horas, e altera a expressão gênica no tecido adiposo de novilhas zebuínas.

### 2.1.2 Experimento 2

Leveduras *Pichia pastoris* podem expressar leptina recombinante bovina biologicamente ativa, tanto induzidas com metanol (utilizando o promotor do gene *AOX1*), quanto constitutivamente (utilizando o promotor do gene *GAP*).

## 2.2 OBJETIVOS

### 2.2.1 Experimento 1

1) Avalliar o efeito da administração crônica de 4,8 µg/kg PV, duas vezes ao dia, na concentração sérica de leptina de novilhas zebuínas pré-púberes recebendo dieta com baixa densidade energética.

2) Avaliar o efeito da dieta e da administração crônica de leptina exógena na expressão gênica do tecido adiposo de novilhas zebuínas.

### 2.2.2 Experimento 2

1) Clonar a região codificadora da leptina bovina e transformar leveduras *Pichia pastoris* utilizando os vetores de expressão pPICZαA e pGAPZαA.
2) Expressar a proteína no meio de cultura e purificá-la.

# 3 REVISÃO DE LITERATURA

## 3.1 PECUÁRIA DE CORTE E PUBERDADE DE NOVILHAS

A raça Nelore (*Bos indicus*) compõe a base da pecuária de corte brasileira, mas apesar de bem adaptada às condições tropicais, atinge a puberdade em idade bem mais avançada que raças européias, mesmo quando criadas em condições semelhantes (RODRIGUES et al., 2002). A idade ao primeiro parto, reflexo direto da idade à puberdade das novilhas (MORAN et al., 1989), influencia diretamente a eficiência e a lucratividade da pecuária de corte, uma vez que fêmeas que parem mais cedo apresentam maior vida reprodutiva, geram maior número de bezerros e levam menos tempo para gerar retorno econômico ao produtor. Assim, um atraso no início da vida reprodutiva aumenta o rebanho não-produtivo da propriedade (recria), reduzindo a rentabilidade da criação de bezerros e a taxa de desfrute do rebanho.

A idade média à puberdade e ao primeiro parto (IPP) do rebanho Nelore brasileiro é alta, ao redor de 22-36 e 44-48 meses, respectivamente (SANTOS; SÁ FILHO, 2006). Segundo Fries et al. (1996), um sistema produtivo baseado em IPP de quatro anos gera taxas de desfrute abaixo dos 15% e muitas fêmeas vazias em recria. Segundo os autores, quando a IPP é reduzida para 36 meses, a taxa de desfrute duplica e se a redução fosse ainda maior, para 27 meses, a taxa de desfrute aumentaria para cerca de 40%. Pode-se dizer, portanto, que a redução na IPP, através de redução da idade à puberdade, é essencial para o aumento da taxa de desfrute do rebanho bovino brasileiro.

A puberdade é o estágio final da maturação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, e é marcada por alterações na concentração de gonadotrofinas e aumento nos níveis de esteróides sexuais circulantes (LEE, 1995; WU et al., 1996). A entrada na puberdade inicia a vida reprodutiva da fêmea e é caracterizada pela primeira ovulação (RAWLINGS et al., 2003), acompanhada do desenvolvimento de um corpo lúteo (CL) capaz de se manter durante um ciclo estral completo (KINDER et al., 1987).

Em animais jovens, a manutenção do nível basal de estradiol, produzido nos ovários, inibe a secreção dos hormônios gonadotróficos hipofisários, principalmente o LH, através de um mecanismo de *feedback* negativo sobre a secreção hipotalâmica do GnRH. Com a aproximação da puberdade, no entanto, a redução no número de receptores de estradiol no hipotálamo diminui gradativamente a sensibilidade deste ao efeito inibitório dos esteróides,

resultando em aumento na secreção de GnRH e, conseqüentemente, na freqüência dos pulsos de secreção de LH. Esta redução do *feedback* negativo do estradiol pode ser considerada o fator endócrino primário necessário para o desencadeamento da puberdade em novilhas (DAY et al., 1987). O aumento na freqüência dos pulsos de LH no período peri-puberal (30 a 80 dias antes da primeira ovulação) estimula o desenvolvimento dos folículos ovarianos. O conseqüente aumento na produção de estradiol estimula o comportamento de cio e, agora através de um mecanismo de *feedback* positivo, estimula a secreção de GnRH e LH, podendo culminar com um pico pré-ovulatório de liberação de LH e com a ovulação (KINDER et al., 1995; RAWLINGS et al., 2003).

O mecanismo fisiológico regulando a obtenção da puberdade ainda não é bem entendido, porém a nutrição possui claro efeito sobre o desenvolvimento reprodutivo dos bovinos. Redmer et al. (1984) afirmou que, na verdade, a puberdade está mais relacionada com o PV que com a idade cronológica propriamente dita. A energia é o nutriente que exerce maior influência na atividade reprodutiva de fêmeas bovinas (SANTOS; AMSTALDEN, 1998), estando o desempenho reprodutivo intimamente associado ao desenvolvimento corporal adequado (BELTRAN, 2007). Experimentos com roedores, ovinos e bovinos demonstram que o atraso no crescimento, causado pela restrição alimentar crônica, resulta em atraso na obtenção da puberdade (FOSTER; OLSTER, 1985; DAY et al., 1986; CHEUNG et al., 1997). Por outro lado, se o crescimento for acelerado, devido à superalimentação, o animal atinge a puberdade mais jovem (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Segundo Imakawa et al. (1986b), a freqüência dos pulsos de LH durante a fase folicular do ciclo estral correlaciona-se positivamente com alterações no PV.

Acredita-se que a influência da nutrição na secreção de LH ocorra através da modulação da secreção de GnRH no hipotálamo, entretanto, sabe-se muito pouco sobre como o animal informa seu status nutricional ao sistema nervoso central e sobre como esta informação é traduzida para sinais neuroendócrinos. Já está bem estabelecido que as reservas de tecido adiposo influenciam a capacidade reprodutiva de duas formas: na idade à primeira ovulação e na habilidade em manter a função reprodutiva durante a fase adulta (SCHILLO, 1992).

Há mais de vinte anos foi proposta a existência de uma relação complexa entre índice de massa corporal e controle central do eixo reprodutivo, regulando a obtenção da puberdade e a manutenção da atividade reprodutiva normal em diversas espécies animais (FRISCH et al., 1980; BRONSON, 1987), sendo a leptina indicada como possível elo entre nutrição e

reprodução, sinalizando a condição corporal ao hipotálamo e exercendo efeito permissivo à obtenção da puberdade (BARASH et al., 1996).

## 3.2 LEPTINA

A leptina é um hormônio protéico de aproximadamente 16 kDa, sintetizado principalmente por adipócitos, primeiramente descrita por Zhang et al. (1994) em camundongos. Inicialmente, a leptina possui 167 aminoácidos, sendo secretada na corrente sanguínea como uma molécula monomérica de 146 aminoácidos, após a clivagem do peptídeo sinalizador de secreção, composto por 21 aminoácidos. Uma vez na circulação, ela vai atuar na regulação do consumo alimentar, do eixo neuroendócrino e de processos imunológicos (ZHANG et al., 1994; HOUSEKNECHT; PORTOCARRERO, 1998; BARB, 1999).

A leptina possui um potente efeito supressor do apetite, além de estimular o gasto de energia, e está sendo considerada como o elo entre nutrição, metabolismo e reprodução (MACIEL et al., 2004a). A observação de que o nível de leptina plasmática é proporcional ao teor de gordura corpórea, refletindo a quantidade de triglicerídeos acumulados no tecido adiposo (MAFFEI et al., 1995), também contribuiu para o desenvolvimento da teoria da ação da leptina como um sinal humoral indicador da quantidade de gordura corporal, ou seja, dos depósitos de energia do organismo.

### 3.2.1 Relação entre leptina e puberdade

Com a aproximação da puberdade, a concentração sérica de leptina aumenta linearmente em diversas espécies, como roedores (AHIMA et al., 1997; QUINTON et al., 1999), humanos (GARCIA-MAYOR et al., 1997; KIESS et al., 1999), suínos (QIAN et al., 1999) e bovinos (GARCIA et al., 2002). Além disso, observa-se que a concentração de leptina plasmática é proporcional ao teor de gordura corporal, e que os níveis de RNA mensageiro (mRNA) de leptina são proporcionais ao tamanho dos adipócitos (HOUSEKNECHT; PORTOCARRERO, 1998; AHIMA; FLIER, 2000; EHRHARDT et al., 2000). Alterações na leptinemia, mediadas pela nutrição, afetam significativamente as funções neuroendócrinas,

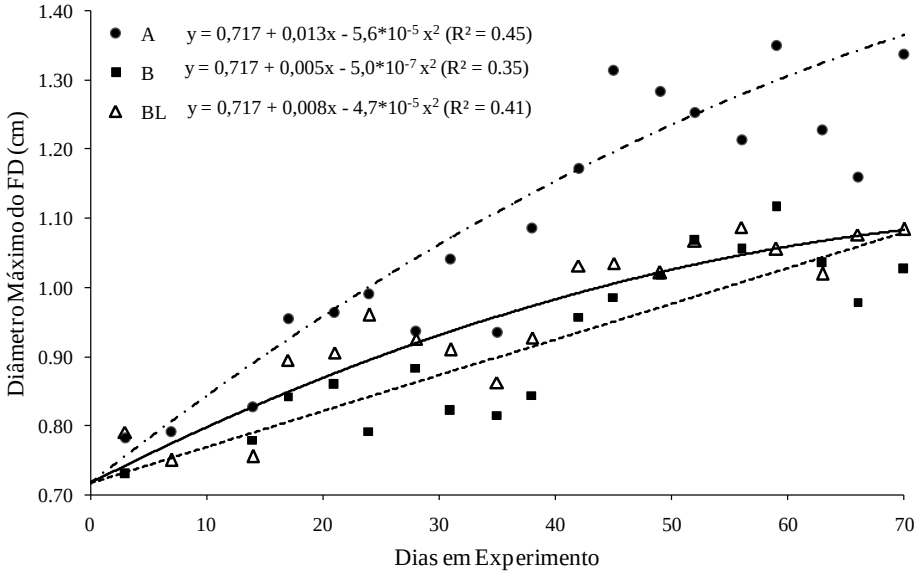
influenciando o potencial reprodutivo de bovinos e outras espécies de mamíferos (KOUTKIA et al., 2003). É possível que a disponibilidade insuficiente de nutrientes ou a baixa condição corporal, seguida pela redução na concentração sérica de leptina, atenue a habilidade de outros sinais em desencadear a puberdade (CUNNINGHAM et al., 1999).

Agindo como um sinal metabólico, a leptina se mostrou capaz de induzir a puberdade em roedores e resgatar camundongos geneticamente obesos (*ob/ob*) da esterilidade (CHEHAB et al., 1997; MOUNZIH et al., 1997). Além disso, diversas linhas de pesquisa apontam a leptina como principal limitante da maturação sexual em novilhas mal alimentadas.

Estudos com bovinos taurinos demonstraram que a restrição alimentar reduz a concentração basal e a pulsatilidade do LH e que a administração de leptina recombinante ovina (oLeptina) reverte o quadro (AMSTALDEN et al., 2002; ZIEBA et al., 2004). Por outro lado, a aplicação de oLeptina diretamente no hipotálamo de novilhas taurinas em jejum, preveniu a redução na frequência dos pulsos de LH e aumentou a liberação de LH mediada por GnRH (MACIEL et al., 2004a). Em estudo realizado com novilhas, Garcia et al. (2002) demonstraram que a maior parte da variação na idade à puberdade encontrada, podia ser explicada pela variação no PV, e que este apresentava alta correlação positiva (R=0,85) com a concentração sérica de leptina. Os autores observaram, também, que a leptina sérica aumentou linearmente a partir da 16ª semana anterior até a semana da primeira ovulação.

Um estudo realizado anteriormente por este grupo de pesquisa demonstrou que a leptina está fortemente relacionada com a condição corporal do animal e que novilhas que entram em puberdade mais precocemente possuem maior expressão de leptina pelas células adiposas (VAICIUNAS et al., 2008). Em outro trabalho, a administração subcutânea de pequenas doses de oLeptina por 56 dias aumentou temporariamente, de forma quadrática, o tamanho dos folículos dominantes de novilhas Nelore pré-púberes com baixa condição corporal (Figura 1), no entanto, não foi capaz de acelerar a primeira ovulação (CARVALHO et al., 2013).

Figura 1 - Regressão do diâmetro máximo do folículo dominante em função do tempo, durante o período de aplicação de leptina (56 dias)




Tratamentos: A – dieta de alta energia (●), B – dieta de baixa energia (■); BL – dieta de baixa energia + 4,8 µg oLeptina/kg PV (△)
Fonte: Carvalho et al. (2013)

Em conjunto, esses estudos demonstram que a leptina exerce um efeito direto no hipotálamo, e possivelmente na hipófise, estimulando a secreção de GnRH e LH durante o estado de subnutrição. É importante salientar que em novilhas bem alimentadas, a aplicação de oLeptina não foi capaz de acelerar o aparecimento da puberdade ou aumentar a secreção de LH (MACIEL et al., 2004b; ZIEBA et al., 2004). Em geral, tanto a restrição alimentar aguda quanto crônica parecem sensibilizar o eixo hipotálamo-hipófise à leptina (DYER et al., 1997a; NAGATANI et al., 2000). Desta forma, acredita-se que em novilhas zebuínas de idade avançada (maior que 18 meses), criadas a pasto e com pouca reserva de gordura corporal, a concentração de leptina circulante seja o fator limitante da secreção de GnRH e da obtenção da puberdade.

Além do efeito central, há também evidências de que a leptina exerça um efeito periférico direto na função ovariana. Observa-se que os tecidos gonadais possuem todas as isoformas do receptor OB (SPICER; FRANCISCO, 1997, 1998). Já foram identificados receptores de leptina nas células da granulosa e da teca, nas células do cumulus oophorus, no oócito e no embrião (AGARWAL et al., 1999).

Diversos experimentos *in vitro*, utilizando cultura de células, demonstraram um efeito direto da leptina nas células da granulosa, o que pode estar envolvido na regulação do

tamanho dos folículos e na qualidade dos oócitos (BOLAND et al., 2001). Entretanto, ao contrário do efeito estimulatório central, o efeito periférico da leptina parece ser inibitório da síntese de esteróides. Vários autores demonstraram que a leptina atenua a esteroidogênese induzida por gonadotrofinas e fatores de crescimento, tanto em células da teca (SPICER; FRANCISCO, 1998; AGARWAL et al., 1999) quanto em células da granulosa isoladas (SPICER; FRANCISCO, 1997; AGARWAL et al., 1999). Karlsson et al. (1997) demonstraram que a leptina suprime a síntese ovariana de estradiol e progesterona *in vitro.* Em ovários bovinos, foi observado um antagonismo direto da leptina sobre o efeito estimulatório da insulina na esteroidogênese das células da granulosa (SPICER; FRANCISCO, 1998), sendo que, na ausência de insulina, a leptina apresentou pouco ou nenhum efeito. Por outro lado, Ruiz-Cortez et al. (2003) relataram um efeito bifásico da leptina em células da granulosa de suínos, nas quais níveis fisiológicos do hormônio estimularam a esteroidogênese, enquanto níveis mais altos a inibiram.

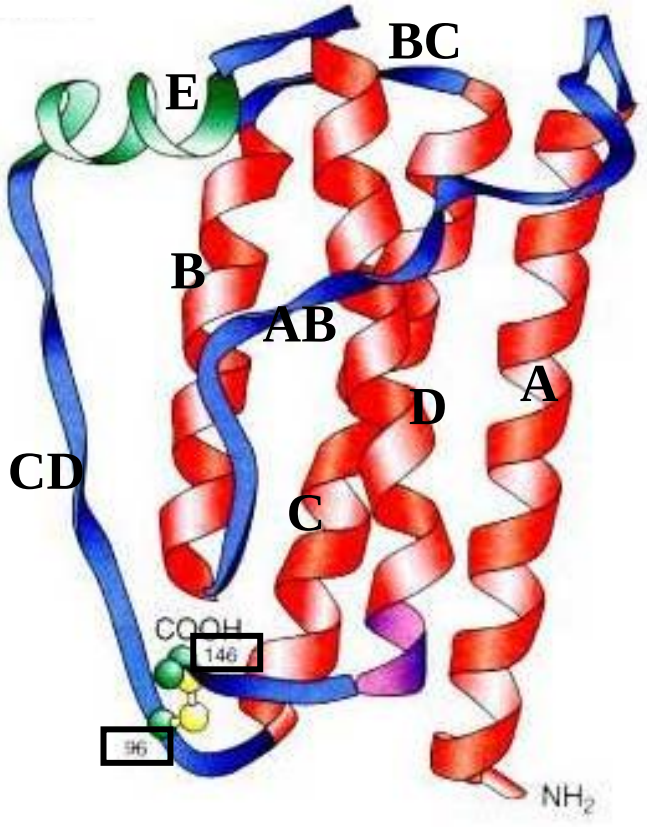
Ainda não se sabe por que a leptina exerce efeito positivo na reprodução e na função ovariana de camundongos *ob/ob*, mas exerce efeitos negativos na esteroidogênese ovariana *in vitro* (SPICER, 2001). Talvez este fato ocorra devido à existência, *in vivo,* de múltiplos sítios de ação da leptina no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e da maioria dos estudos terem utilizados culturas de células isoladas, em condições totalmente diferentes das condições fisiológicas no ambiente ovariano (SWAIN et al., 2004).

### 3.2.2 Estrutura molecular da leptina

A molécula de leptina é um monômero composto por quatro α-hélices antiparalelas com organização *up-up-down-down,* conectadas por duas alças longas e uma alça curta (Figura 2). Apesar de não haver similaridade entre as sequências de aminoácidos, a leptina apresenta estrutura molecular terciária semelhante a proteínas da família das citocinas, como interleucinas (IL), fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) e o hormônio de crescimento humano (hGH), por exemplo, (DE VOS et al., 1992; HILL et al., 1993; ZHANG et al., 1997). A semelhança estrutural é observada também entre os receptores dessas proteínas, sobretudo com a sub-unidade GP130 do receptor da IL-6 (CONSIDINE; CARO, 1996; CAMPFIELD et al., 1997).

A sequência de aminoácidos da leptina apresenta 67% de homologia entre diversas espécies, como a humana, bovina, suína e murina (Figura 3). As regiões mais conservadas das α-hélices formam um núcleo hidrofóbico e podem apresentar papel importante na manutenção da integridade estrutural da proteína (ZHANG et al., 1997).

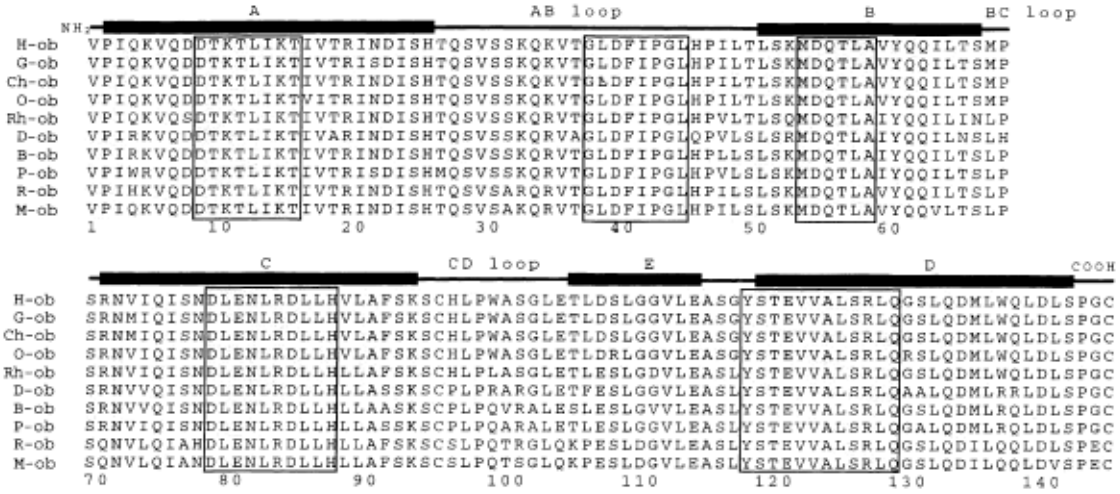
Figura 2 - Diagrama estrutural da molécula de leptina




As quatro α-hélices (A, B, C e D) estão em vermelho; a hélice adicional curta (E) está em verde e as alças de conexão (AB, BC e CD) estão em azul. A ponte dissulfeto entre os resíduos de cisteína 146 (da extremidade C-terminal) e 96 (da alça CD) está destacada em caixas pretas

Fonte: adaptado de Zhang et al. (1997)

Figura 3 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da leptina humana (H-ob), de gorila (G-ob), de chimpanzé (Ch-ob), de orangotango (O-ob), de macaco Rhesus (Rh-ob), de cachorro (D-ob), de bovinos (B-ob), de suínos (P-ob), de ratos (R-ob) e de camundongos (M-ob)




A estrutura secundária da molécula apresenta as quatro α-hélices (A, B, C e D), as duas alças longas (AB e CD), a alça curta (BC). As regiões mais conservadas estão em destaque.

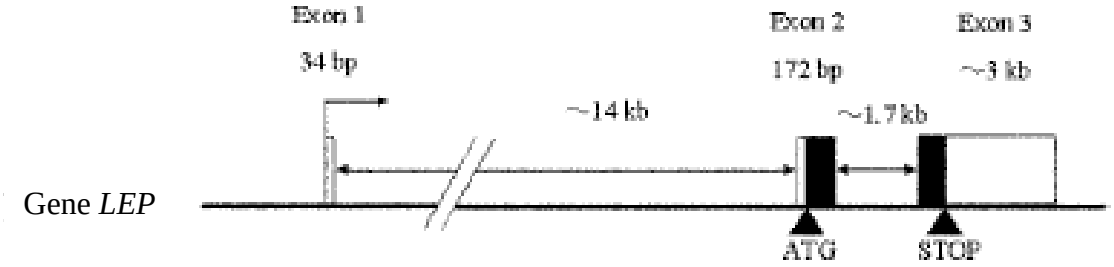
Fonte: Zhang et al. (1997)

A leptina possui dois resíduos de cisteína (Cys 96 e Cys 146), que formam uma ponte dissulfeto entre a extremidade C-terminal da proteína e o início da alça CD (Figura 2), torcendo a última volta da hélice D em direção à alça CD. A localização da ponte dissulfeto é altamente conservada entre as espécies e a presença de mutações nessa região, resulta em moléculas biologicamente inativas, indicando que a ponte dissulfeto e a consequente região torcida da hélice D são importantes na manutenção da estrutura terciária da proteína e na ligação dela com seu receptor (ZHANG et al., 1997).

### 3.2.3 Gene da leptina

O gene da leptina (*LEP*) é composto por três exons, separados por dois íntrons (Figura 4). A região codificante está localizada nos éxons 2 e 3, separados por um íntron de aproximadamente 1,7 kb, e apresenta 501 nucleotídeos, os quais codificam uma molécula com 167 aminoácidos, composta por uma sequencia sinalizadora de secreção de 21 aminoácidos, a qual direciona a molécula de leptina para a via secretória da célula, e uma sequencia de 146 aminoácidos, representando a molécula ativa (TANIGUCHI et al., 2002).

Figura 4 - Organização molecular do gene da leptina




Fonte: Taniguchi et al. (2002)

Em bovinos o gene *LEP* localiza-se no cromossomo 4, sendo a organização exon-íntron muito conservada entre diferentes espécies, como camundongos, humanos e bovinos (TANIGUCHI et al., 2002). Ji et al. (1998) amplificaram, clonaram e expressaram e *E. coli* um fragmento de 438 pb do gene da leptina bovino, correspondente à molécula ativa, isto é, excluindo a sequência sinal de secreção. Analisando a sequência do cDNA, os autores observaram 87% de homologia com as sequências de camundongos e humanos. Já o sequenciamento amino terminal do polipeptídeo produzido (30 resíduos de aminoácidos) apresentou 100% de homologia com a leptina humana e de camundongo.

### 3.2.4 Mecanismo de ação da leptina

O hipotálamo parece ser o principal local de ação da leptina, uma vez que possui grande número de receptores, principalmente nas áreas associadas com o controle do apetite, da reprodução e do crescimento (DYER et al., 1997a; LIN et al., 2000). A subnutrição é considerada um dos fatores primários associados com o aumento do número de receptores de leptina no hipotálamo ventromedial de ovelhas (DYER et al., 1997a) e na hipófise e hipotálamo de ratos (ZAMORANO et al., 1997), de forma que provavelmente o jejum e a restrição energética crônica e severa sensibilizem o eixo hipotálamo-hipófise à ação da leptina, reduzindo a secreção hipofisária de LH (MACIEL et al., 2004a).

Os receptores de leptina (OB-R) são proteínas monoméricas transmembrana encontradas em seis isoformas, diferindo quanto ao tamanho do domínio intracelular, mas com domínios extracelulares idênticos. As isoformas do receptor de leptina são resultantes do processamento alternativo do RNA mensageiro produzido pelo gene *LEP*.

A forma longa do receptor (OB-Rb) está presente em várias regiões do cérebro, principalmente nos núcleos arqueado, dorsomedial, ventromedial e paraventricular do hipotálamo, regiões chave no controle do apetite e do peso corporal. Foram observadas grandes quantidades de receptores OB-Rb nos núcleos arqueado e ventromedial do hipotálamo e na hipófise anterior de porcos, ovelhas, ratos e camundongos (TARTAGLIA et al., 1995; DYER et al., 1997; ZAMORANO et al., 1997; LIN et al., 2001). As quatro formas curtas (OB-Ra; OB-Rc; OB-Rd; OB-Rf) estão presentes nos demais tecidos (adiposo, gástrico, gônadas, placenta e etc) (BJØRBAEK et al., 1998).

Existe também uma forma solúvel (OB-Re), que consiste no domínio extracelular do receptor OB (HOUSEKNECHT et al., 1996; TARTAGLIA, 1997) e é considerada uma das proteínas carreadoras da leptina no plasma (FRIEDMAN; HALAAS, 1998). Acredita-se que este receptor também possua papel crítico no transporte da leptina pela barreira hemato-encefálica (GOLDEN et al., 1997).

Devido à homologia estrutural com o receptor de interleucina 6 (IL-6) e ao fato de apresentarem vias sinalizadoras comuns, os receptores de leptina são considerados membros da família dos receptores de citocina classe I. O OB-Rb é a principal isoforma responsável pela transdução do sinal da leptina no hipotálamo (TARTAGLIA et al., 1995; TARTAGLIA, 1997) e, assim como os outros membros desta família, não possui atividade catalítica intrínseca e está constitutivamente ligado a uma proteína citossólica com atividade de tirosina quinase, a Janus-quinase (JAK).

Os receptores OB são ativados através de um processo de homodimerização. A ligação OB-Rb/leptina desencadeia a atividade catalítica da JAK, que se autofosforila em vários resíduos de tirosina, tornando-se ativa e ativando outra JAK, ligada ao segundo receptor (TARTAGLIA, 1997; HOUSEKNECHT; PORTOCARRERO, 1998). As duas JAK ativadas catalisam a fosforilação dos resíduos 985 e 1138 de tirosina do receptor OB-Rb (MUNZBERG; MYERS, 2005), criando três sítios ativos (um na molécula JAK e dois nos resíduos fosforilados do receptor), que darão continuidade à sinalização. Ocorre, então, o recrutamento de moléculas da família de “transdutores de sinal e ativadores de transcrição” (STAT, principalmente a STAT-3), que são fosforiladas, dimerizam e translocam para o

núcleo, conduzindo o sinal gerado pela leptina e determinando a transcrição dos genes codificadores de neurotransmissores específicos (BJØRBAEK et al., 2004).

Ao mesmo tempo, a leptina induz a expressão da proteína SOCS-3, que inibe a sinalização OB-Rb/JAK (STARR et al., 1997). Níveis elevados de SOCS-3 foram observados no hipotálamo de animais obesos e nos casos de resistência à leptina (BJØRBAEK et al., 1999; BANKS et al., 2000), e a administração de leptina, por sua vez, aumentou a expressão de mRNA de SOCS-3 no hipotálamo de camundongos *ob/ob* (geneticamente obesos por não produzirem leptina ativa, devido à terminação prematura da tradução) e outros mamíferos (BJØRBAEK et al., 1999).

Sullivan e Moenter (2004) propuseram que o papel da leptina como sinal metabólico ligando o status energético ao eixo neuroendócrino ocorreria por ação direta nos neurônios secretores de GnRH. No entanto, o mais provável é que a ação da leptina seja mediada por sistemas de neuropeptídeos hipotalâmicos comprovadamente envolvidos em diversas vias nervosas relacionadas com o controle do apetite, do peso corporal, de neurônios produtores de GnRH e do início da puberdade, como o neuropeptídeo Y (NPY), a pro-opiomelanocortina (POMC) e o ácido gama-aminobutírico (GABA), entre outros (CUNNINGHAM et al., 1999; IQBAL et al., 2001; WILLIAMS et al., 2002).

O NPY é um dos neuropeptídeos mais abundantes no hipotálamo e possui efeitos divergentes, tanto ativando quanto inibindo a secreção de GnRH, dependendo de fatores como jejum ou alimentação *ad libitum* por exemplo. A localização de grande quantidade de mRNA de receptor OB em áreas com importante expressão do gene codificador do NPY, no hipotálamo, é evidência de que este neuropeptídeo representa um alvo em potencial para a leptina (CUNNINGHAM et al., 1999; IQBAL et al., 2001). Apesar de ser capaz de estimular agudamente a secreção de GnRH em animais bem nutridos, o efeito mais marcante do NPY ocorre durante o estresse nutricional, quando há pequena quantidade de tecido adiposo (KALRA; KALRA 1996). Em animais mal nutridos, com baixo ECC, a expressão de leptina é suprimida e o nível de NPY central aumenta bastante, resultando em inibição da secreção hipotalâmica de GnRH e, consequentemente, da secreção hipofisária de LH (KALRA et al., 1999).

## 3.3 EXPRESSÃO DE LEPTINA RECOMBINANTE EM SISTEMAS HETERÓLOGOS

A escolha de um sistema adequado para a expressão de proteínas heterólogas deve considerar as características e a aplicação do composto a ser expresso, adotando critérios tanto econômicos quanto de segurança (STRASSER; GELLISSEN, 1998). O sistema ideal combina características que atendam a ambos os critérios, provendo um sistema de produção de compostos proteicos processados e modificados de baixo custo (GELLISSEN, 2000).

Desde que Zhang et al. (1994) inicialmente clonaram a leptina humana e de camundongos, vários outros autores têm reportado resultados similares em outras espécies (NEUENSCHWANDER et al., 1996; PFISTER-GENSKOW et al., 1996; SIVITZ et al., 1996). A alta homologia entre espécies tem se mostrado muito vantajosa neste tipo de estudo, em que leptina recombinante produzida a partir de uma espécie é utilizada para tratamentos em outras (BARASH et al., 1996; STEPHENS et al., 1995), no entanto, a disponibilidade limitada e o alto custo da leptina recombinante humana e de camundongo, tornam proibitiva sua utilização para estudos em animais de produção. A partir do RNA isolado de amostras de tecido adiposo de ovelhas, Dyer et al. (1997b) produziram cópias de cDNA codificando para leptina e observaram que tal cDNA apresentou alta homologia com sequências previamente publicadas de leptina humana, de camundongo e de bovinos (ZHANG et al., 1994; PFISTER-GENSKOW et al., 1996).

A bactéria *Escherichia coli* é o hospedeiro mais utilizado para a produção de leptina recombinante, assim como de outras proteínas, sendo capaz de produzir altos níveis da proteína. No entanto, a produção costuma ocorrer por formação de corpos de inclusão (GERTLER et al., 1998; JEONG; LEE, 1999; PARK et al., 2001), dificultando a extração e purificação da proteína. O processo de recuperação empregado nesses casos, através da utilização de meios desnaturantes, seguida por renaturação, gera grande variabilidade na atividade biológica da proteína recombinante (VARNERIN et al., 1998; ZAMORANO et al., 1997). Uma alternativa possível seria seu direcionamento para o periplasma da bactéria, mas neste caso, apesar de a proteína recombinante apresentar atividade semelhante à da proteína nativa, sua produção é ineficiente (GUISEZ et al., 1998).

Leveduras são organismos eucariotos inferiores unicelulares, que possuem organização celular semelhante à dos organismos eucariotos superiores, de forma que muitas de suas proteínas são estrutural e funcionalmente similares às suas homólogas, presentes em mamíferos. São organismos de manipulação segura, uma vez que não contêm pirógenos,

patógenos ou inclusões virais (GELLISSEN, 2000); apresentam genoma pequeno (cerca de 200 vezes menor que o dos mamíferos), facilitando a manipulação genética; apresentam rápido crescimento em meio de baixo custo; produzem altas densidades celulares e possuem processos simples e validados de monitoração da produção (SUDBERY, 1996).

Sistemas de expressão baseados em leveduras apresentam uma importante vantagem sobre os sistemas procarióticos, como os baseados na *E. coli*, pois a passagem da proteína de interesse pela via secretória da levedura permite a ocorrência de eventos pós-tradução, como maturação proteolítica, *folding*, formação de pontes dissulfeto, adição de certos lipídios e O- e N- glicosilação, por exemplo. Desta forma, muitas proteínas que seriam produzidas como corpos de inclusão inativos em sistemas bacterianos, são produzidas como moléculas biologicamente ativas (GELLISSEN, 2000; CEREGHINO; CREGG, 2000).

Além de bactérias e leveduras, outros sistemas podem ser utilizados na produção de proteínas. Células de insetos, como *Spodoptera* e *Trichoplusia* são, geralmente, competentes na glicosilação de proteínas recombinantes, com a vantagem de reconhecer as sequências de peptídeos sinalizadores de forma semelhante às células de mamíferos (KING; POSSE, 1992), entretanto, problemas já foram reportados com relação à super-glicosilação de enzimas após a secreção (WAGNER et al., 1996). Por último, células de mamíferos também já foram utilizadas para a expressão de diversas proteínas, entretanto a purificação dessas proteínas é complicada e pode resultar em baixo rendimento (MORTON; POTTER, 2000).

## 3.4 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM *PICHIA PASTORIS*

Algumas espécies de leveduras da subfamília Saccharomycetoidea, chamadas metilotróficas facultativas, são capazes de crescer em meios contendo metanol como única fonte de carbono (BARNETT et al., 1990). Estas espécies apresentam vantagens sobre outras leveduras, como o *Saccharomyces cerevisiae*, uma vez que não apresentam tendência à super-glicosilação e que a adição de manoses terminais ocorre por ligações α1,2, ao invés das ligações α1,3 do *S. cerevisiae*, consideradas alergênicas (MONTESINO et al., 1998; BRETTHAUER; CASTELLANO, 1999).

Hoje, várias destas espécies, como as pertencentes ao gênero *Pichia*, representam poderosos sistemas de expressão de proteínas heterólogas, como por exemplo: fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), vacinas contra hepatite B, soro albumina humana,

fitase e outras (GELLISSEN; MELBER, 1996; HOLLENBERG; GELLISSEN, 1997; CREGG, 1999).

A *P. pastoris* tem sido utilizada para a expressão de proteínas heterólogas tanto para a pesquisa básica, quanto para fins industriais (HIGGINS et al., 1998). É um organismo facilmente manipulável, capaz de expressar proteínas em altos níveis, tanto intra quanto extracelularmente. Além de ser capaz de processar proteínas eucarióticas de forma semelhante aos organismos superiores, ela secreta apenas baixos níveis de proteínas endógenas e, uma vez que seu meio de cultura é pobre em proteínas, o processo de purificação da proteína de interesse, que responde pela maioria das proteínas presentes no meio de cultura, fica grandemente facilitado. Mais de 400 proteínas, da endostatina humana à proteína da seda da teia de aranhas, já foram produzidas por esta espécie (CEREGHINO; CREGG, 2000).

Comparada com outros sistemas eucarióticos de expressão, a *P. pastoris* apresenta inúmeras vantagens, uma vez que não apresenta endotoxinas ou problemas de contaminação viral, como nos sistemas de cultura de células animais. As condições de crescimento são ideais para a produção de proteínas heterólogas em larga escala, pois os componentes do meio de cultura são bem definidos e apresentam baixo custo, consistindo de fontes puras de carbono (glicose, glicerol e metanol), biotina, sais, elementos traço e água. O meio é livre de elementos não definidos, que podem ser fonte de pirógenos ou toxinas, sendo compatível com a produção de fármacos para uso em humanos. Como a *P. pastoris* cresce em meio de pH relativamente baixo e com metanol, é pouco provável que ocorra contaminação deste meio com outros microorganismos (CEREGHINO; CREGG, 2000).

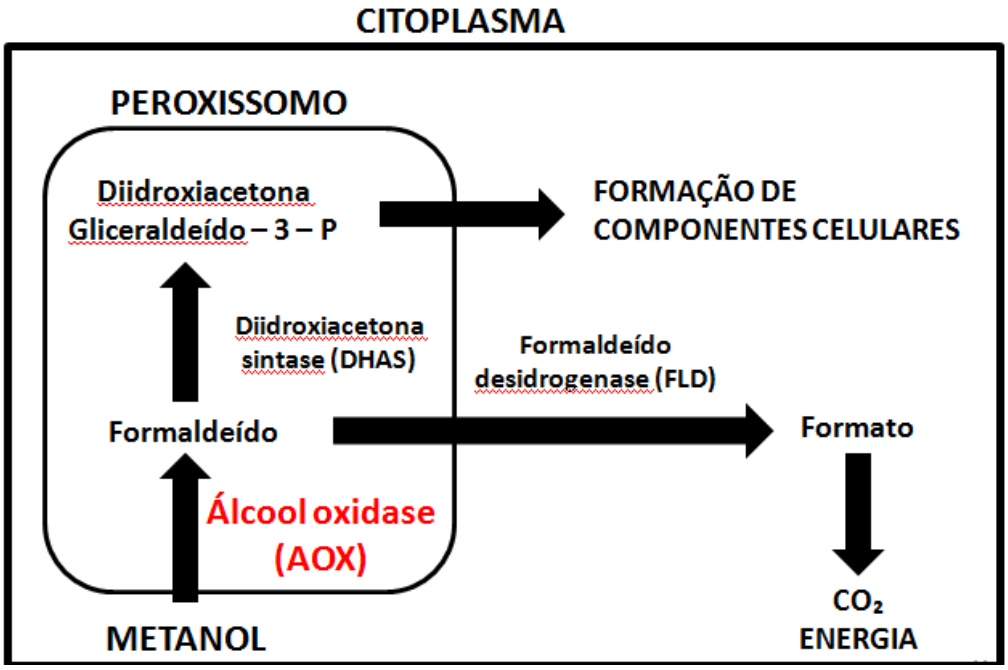
Outra vantagem refere-se ao fato de a *P. pastoris* não ser uma forte fermentadora, como o *S. cerevisiae*. A fermentação realizada pelas leveduras gera etanol, o qual, em culturas de alta densidade, pode rapidamente atingir níveis tóxicos (“efeito Crabtree”). Para uma produção economicamente viável de proteínas recombinantes, a concentração de proteínas no meio deve ser proporcional à quantidade de células, sendo necessário, então, atingir níveis de alta densidade celular, os quais não são facilmente obtidos com o *S. cerevisiae*. Em contraste, as cepas produtoras de *P. pastoris* são facilmente cultivadas e densidades celulares de aproximadamente 100 g/L de peso seco, ou até maiores (TORRES; MORAES, 2000).

### 3.4.1 Metabolismo do metanol

Sendo uma levedura metilotrófica, a *P. pastoris* é capaz de utilizar o metanol como única fonte de carbono, na ausência de glicose, sendo que a base para sua utilização como sistema de expressão de proteínas heterólogas reside na observação de que certas enzimas, necessárias para o metabolismo do metanol, estão presentes em grandes concentrações apenas quando as células crescem em meios ricos em metanol (EGLI et al., 1980; VEENHUIS et al., 1983).

O primeiro passo da via de metabolismo do metanol é a oxidação deste a formaldeído pela enzima álcool oxidase (AOX), reação que ocorre dentro de peroxissomos. Parte do formaldeído produzido sai do peroxissomo e entra na via citoplasmática de geração de energia, sendo oxidado a formato pela enzima formaldeído desidrogenase (FLD) e, em seguida, a dióxido de carbono pela enzima formato desidrogenase (FMDH). O restante do formaldeído, sob ação da enzima diidroxiacetona sintase (DHAS), é transformado em diidroxiacetona e gliceraldeído-3-fosfato, os quais saem para o citoplasma e são assimilados para a formação de componentes celulares (GELLISSEN, 2000) (Figura 5). O controle da síntese destas enzimas ocorre em nível transcricional e seu padrão de expressão varia de acordo com a fonte de carbono presente no meio de cultura. Diversos genes codificadores das oxidases já foram identificados e clonados, sendo que suas fortes e reguláveis regiões promotoras representam interessantes elementos de controle para a expressão de genes heterólogos (SHEN et al., 1998).

Figura 5 - Via do metanol em *Pichia pastoris*




### 3.4.2 Promotor do gene *AOX1*

Promotores são regiões no DNA que controlam a transcrição de determinado gene. Apesar de a *P. pastoris* ser um dos mais utilizados sistemas de expressão de proteínas recombinantes baseados em leveduras, ainda há apenas um limitado número de promotores e elementos reguladores disponíveis, sendo que a maioria deles são derivados de genes envolvidos com o metabolismo do metanol.

Existem dois genes que codificam a álcool oxidase em *P. pastoris*, o *AOX1* e o *AOX2*, sendo que o *AOX1* é o principal responsável pela atividade da enzima na célula (ELLIS et al., 1985; TSCHOPP et al., 1987; CREGG et al., 1989).

O controle da expressão do gene *AOX1* ocorre em duas etapas: repressão e indução, sendo que a presença do indutor, metanol, é necessária para que haja níveis detectáveis de expressão do gene. Por outro lado, o crescimento em meio com glicose reprime sua transcrição, mesmo na presença do metanol (ELLIS et al., 1985; KOUTZ et al., 1989; TSCHOPP et al., 1987). Observa-se que em meio contendo metanol, cerca de 5% do RNA poli(A)$^+$ (mRNA) é originado do gene *AOX1* e a enzima AOX constitui até 30% do total de

proteínas da célula, enquanto a FMDH e a DHAS representam até 20% do total de proteínas (GELLISSEN, 2000).

A maioria dos vetores de expressão utilizados em *P. pastoris* utilizam o promotor e a sequência de terminação da transcrição do gene *AOX1*, entre os quais encontra-se o sítio múltiplo de clonagem (MCS), onde é inserido o gene de interesse (KOUTZ et al., 1989). Os melhores resultados de expressão são geralmente obtidos quando a primeira sequência ATG (início da transcrição) do gene heterólogo é inserida o mais próximo possível da sequência ATG do *AOX1*. Na maioria dos MCS, essa posição coincide com o primeiro sítio de restrição (CEREGHINO; CREGG, 2000).

Apesar de o promotor do gene *AOX1* ($P_{AOX1}$) já ter sido empregado com sucesso na expressão de diversas proteínas heterólogas, como sua indução utiliza metanol, em alguns casos ele pode não ser indicado, como para produção de produtos alimentícios, já que o metanol é tóxico. Além disso, o metanol representa um potencial risco de incêndio, principalmente nas grandes quantidades utilizadas em fermentadores de larga escala. Assim, existem vetores utilizados em sistemas de *P. pastoris* que utilizam outros promotores, que não são induzidos pelo metanol, como o promotor do gene *GAP*, que é expresso constitutivamente (CEREGHINO; CREGG, 2000).

### 3.4.3 Promotor do gene *GAP*

Estudos em *P. pastoris* já demonstraram que o promotor do gene *GAP* ($P_{GAP}$), codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), é expresso de forma constitutiva na presença de glicose. Tal expressão ocorre em altos níveis, comparáveis aos observados para o promotor *AOX1*. A atividade do $P_{GAP}$ em glicerol e metanol é aproximadamente 2/3 e 1/3 da observada em presença de glicose, respectivamente (CEREGHINO; CREGG, 2000).

A vantagem da utilização do $P_{GAP}$ está na não necessidade de indução com metanol, além de também não haver a necessidade de mudar a cultura de um meio para o outro, para induzir a expressão, resultando em menor manipulação das células. Além disso, já foi demonstrado que células sob controle do $P_{GAP}$ expressam proteínas em níveis mais altos em um período mais curto de tempo (ZHANG et al., 2009).

Entretanto, como o gene *GAP* é expresso de forma constitutiva, não representa uma boa opção para a expressão de proteínas que sejam tóxicas para a levedura (CEREGHINO; CREGG, 2000). Nesses casos, o $P_{AOX1}$ seria mais indicado, uma vez que permite controle sobre a expressão, sendo que a cultura pode ser mantida saudável sob condições repressoras, até que a indução seja desejável, o que representa uma importante precaução para minimizar a seleção de mutantes que não expressam a proteína de interesse durante o crescimento da cultura.

### 3.4.4 Glicosilação

A maior vantagem da *P. pastoris* sobre os sistemas bacterianos de expressão está no fato de que as leveduras podem realizar diversas modificações pós-traducionais, tipicamente associadas com eucariotos superiores. Além disso, as proteínas recombinantes podem ser produzidas tanto intra quanto extracelularmente, sendo que direcionar a proteína para a secreção no meio extracelular representa um importante primeiro passo para a sua purificação, já que a levedura secreta baixos níveis de proteínas endógenas.

A glicosilação é uma modificação pós-traducional que ocorre, primeiramente, no retículo endoplasmático e, posteriormente, no aparelho de Golgi, durante a passagem da proteína pela via secretória da célula. Existem dois tipos de glicosilação: a N- e a O-glicosilação. Na N-glicosilação, os carboidratos são ligados ao nitrogênio da amida de resíduos de asparagina de sequências de reconhecimento Asn-X-Ser/Thr. Esse processo ocorre durante a tradução e pode afetar o enovelamento da proteína, afetando sua estrutura terciária. Já na O-glicosilação, os carboidratos são adicionados ao oxigênio das hidroxilas de resíduos de serina ou treonina, apenas após a tradução e sobre moléculas já totalmente enoveladas (ALBERTS et al., 1989).

A glicosilação pode afetar as propriedades físicas e químicas das proteínas, alterando solubilidade, massa e carga elétrica, e também estabilizando sua conformação e protegendo-as contra a proteólise. A maioria das proteínas produzidas pela *P. pastoris* são glicosiladas, entretanto, essa glicosilação, assim como ocorre em outros fungos, não ocorre exatamente como nos mamíferos e pode ser problemática, podendo ou não afetar sua atividade biológica. Observou-se que a *P. pastoris* glicosilou aproximadamente 15% da IGF-I humana, apesar de essa proteína não ser glicosilada em humanos (CEREGHINO; CREGG, 2000).

Comparando o padrão de glicosilação da *P. pastoris* com o *S. cerevisiae*, observou-se que o tamanho da cadeia de carboidratos adicionados pela *Pichia* é bem menor que a adicionada pelo *S. cerevisiae*, o que representa uma vantagem sobre o último. Além disso, a estrutura destes oligossacarídeos é muito similar à adicionada em mamíferos e, por não ser capaz de adicionar manoses terminais com ligações α-1,3, como o *S. cerevisiae*, as proteínas produzidas em *Pichia* são menos imunogênicas. Entretanto, se a glicosilação não é desejada, uma opção é produzir as proteínas de interesse intracelularmente. Observa-se também que o padrão de glicosilação da *Pichia* varia muito com a proteína sendo expressa, sendo que o motivo pelo qual em algumas proteínas são adicionadas cadeias de carboidratos extremamente longas (hiperglicosilação), enquanto em outras não, ainda não está definido (LI et al., 2007).

Em mamíferos, a O-glicosilação é composta por uma variedade de oligossacarídeos, incluindo N-acetilgalactosamina, galactose e ácido siálico. Já nos eucariotos inferiores, como a *P. pastoris*, apenas manoses são adicionadas. Entretanto o número de manoses, o tipo de ligação e a frequência e especificidade da O-glicosilação ainda não foi completamente determinada. Da mesma forma, a N-glicosilação realizada pela *P. pastoris* e outros fungos também ocorre de forma diferente que nos eucariotos superiores. Algumas proteínas são N-glicosiladas de forma semelhante, mas outras são hiperglicosiladas, aumentando sua massa e, consequentemente, o tamanho da banda formada em análises de SDS-PAGE e Western blot (CEREGHINO; CREGG, 2000).

Baseado nos dados existentes, há cerca de 50 a 75% de chance de sucesso na expressão de qualquer proteína em níveis razoáveis, com o sistema *P. pastoris*. O maior obstáculo enfrentado parece ser o sucesso inicial, ou seja, obter qualquer nível de expressão de uma determinada proteína. Depois de ultrapassado este obstáculo, existe uma série de parâmetros bem definidos, que podem ser manipulados no sentido de otimizar a expressão. Apesar de haver relativamente poucos exemplos de níveis de expressão acima de 10g/L, há muitos exemplos de expressões de 1g/L ou mais, tornando o sistema *P. pastoris* um dos mais produtivos sistemas eucarióticos de expressão disponíveis (CREGG et al., 2000).

# 4 MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 LOCAIS

O experimento 1 foi conduzido no Confinamento Experimental e no Matadouro Escola, da Coordenadoria do *campus* Administrativo de Pirassununga, na Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Genômica Funcional, no Centro de Pesquisas em Bovinos (CEPBOV), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP.

O experimento 2 foi realizado no Laboratório de Genômica Funcional, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil; e no Laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

## 4.2 EXPERIMENTO 1

### 4.2.1 Animais e tratamentos

As amostras de tecido adiposo e de sangue utilizadas foram obtidas em experimento prévio, aprovado pelo Comitê de Bioética da Universidade de São Paulo (protocolo 1050/2007) (CARVALHO, 2009).

Resumidamente, 36 novilhas pré-púberes (entre 18 e 20 meses de idade) da raça Nelore foram distribuídas aleatoriamente em três grupos experimentais, de acordo com a dieta oferecida e com o tratamento hormonal aplicado: A) dieta de alta energia; B) dieta de baixa energia; BL) dieta de baixa energia com aplicação subcutânea de leptina recombinante ovina (oLeptina). A dieta de alta energia era composta por silagem de milho, farelo de soja, milho moído e suplemento mineral, sendo formulada para permitir um ganho médio diário (GMD) de 1,2 kg PV/dia. Já a dieta de baixa energia era composta por bagaço de cana *in natura*,

silagem de milho, farelo de soja, ureia e suplemento mineral, sendo formulada para permitir um GMD de 0,3 kg PV/dia.

Após 14 dias de adaptação à dieta, as novilhas do grupo BL receberam 4,8 µg/kg PV de leptina recombinante ovina altamente purificada (oLeptina – Protein Rehovolt, Israel) via subcutânea, duas vezes ao dia, com intervalo de 12 horas entre as aplicações, por 56 dias. O esquema de aplicação visou elevar a concentração plasmática de leptina para valores acima de 5 ng/ml por cerca de 8 a 12 horas (MACIEL et al., 2004a). Os animais foram avaliados por ultrassonografia transretal duas vezes por semana, até a obtenção da puberdade. O animal foi considerado púbere após a detecção de corpo lúteo (CL) pela ultrassonografia transretal, confirmado como funcional por concentração de progesterona sanguínea maior que 1 ng/mL (OYEDIPE et al., 1986). Uma descrição detalhada do tratamento hormonal e da avaliação reprodutiva pode ser encontrada em Carvalho (2009).

### 4.2.2 Dosagem da concentração de leptina sérica

Para a determinação da concentração sérica de leptina, quatro novilhas de cada grupo foram selecionadas, aleatoriamente, para coletas de sangue em seis pontos pré-definidos no tempo: ao início das dietas experimentais (7 dias antes da primeira aplicação de oLeptina); durante a administração da oLeptina (7, 14 e 28 dias após a primeira aplicação); e 11 dias após o término do tratamento hormonal.

As amostras de sangue (10 mL) foram coletadas por punção da veia jugular, em tubos Vacutainer® secos. O sangue foi imediatamente armazenado em isopor com gelo e levado ao laboratório, onde foi centrifugado a 1.500 x *g* por 30 minutos a 4°C, em no máximo duas horas após a coleta, de modo a minimizar a degradação da leptina. O soro foi transferido para tubos Eppendorff® de 1,5ml e armazenado em freezer a -20°C.

A determinação da leptina sérica foi realizada pelo método ELISA, utilizando kit específico para leptina bovina (Cusabio Biotech Co., Ltd., Hubei, China), de acordo com recomendações do fabricante (LI et al., 2010). A concentração de leptina nas amostras foi obtida em software Master Plex QT3.0 (MiraiBio Inc., Alameda, CA). A curva padrão da leptina foi de 1,56 a 100 ng/mL, e o coeficiente de variação intra e interensaio foi de 7,6 e 12,6%, respectivamente.

### 4.2.3 Extração do RNA total do tecido adiposo

Oito novilhas de cada grupo foram abatidas no segundo dia após a detecção de um CL na ultrassonografia, ou seja, após a obtenção da puberdade, para coleta de amostras de tecidos, incluindo amostras do tecido adiposo mesentérico, perirenal e subcutâneo. O tecido adiposo subcutâneo foi coletado acima da 11ª costela. Os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C (MAGALHÃES, 2010).

O RNA total foi extraído através do método do Trizol® (Invitrogen), segundo metodologia adaptada de Chomczynski e Sacchi (1987). Aproximadamente 2,0 g de tecido adiposo foram pesados, macerados em cadinho e pistilo com nitrogênio líquido e transferidos para tubo Falcon (50 mL) contendo 6 mL de Trizol. A amostra foi homogeneizada em Turraz e centrifugada a 2.900 x *g* por 35 minutos a 4°C, havendo separação em três fases: uma fase gordurosa superior formada por triglicerídeos, um precipitado no fundo e uma fase aquosa intermediária. A fase aquosa foi transferida para 4 a 5 microtubos de 1,5 mL (1,0 mL por tubo), sendo o restante descartado.

Adicionou-se 200 µL de clorofórmio a cada microtubo, os quais foram agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados por 3 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 12.000 x *g* por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante (aproximadamente 0,6 mL) transferido para microtubos contendo 600 µL de solução clorofórmio:butanol (4:1) preparada na hora. Os tubos foram agitados vigorosamente por 10 segundos e centrifugados a 12.000 x *g* por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante (aproximadamente 0,5 mL) foi, então, transferido para novos microtubos contendo 500 µL de isopropanol gelado e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 12.000 x *g* por 10 minutos a 4°C, havendo formação de *pellet* no fundo dos microtubos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de etanol 75% a cada microtubo. Os tubos foram agitados em vórtex, até total desprendimento do *pellet*, e centrifugados a 7.000 x *g* por 5 minutos a 4°C. O etanol foi descartado e os tubos foram mantidos invertidos, em temperatura ambiente por 15 minutos, para secar. O RNA total extraído foi ressuspendido em 40 µL de água DEPC, sendo o conteúdo dos microtubos transferido para um tubo único. A qualidade do RNA extraído foi avaliada em espectrofotômetro GeneQuant Pro (GE Healthcare), pela razão da absorbância a 260 e 280 nm. A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1,2%, pela presença de bandas referentes às frações 5,8S, 18S e 28S do rRNA.

Para reduzir a contaminação com DNA genômico, amostras de 1,5 µg de RNA total de cada tecido foram tratadas com DNase I (Life Technologies). O RNA foi adicionado de 1 µL de tampão DNase I; 1 µL de DNase I e 8 µL de água DEPC, sendo incubado em temperatura ambiente por 15 minutos. Adicionou-se 1 µL de EDTA 25 mM e a solução foi aquecida em bloco a 65°C por 10 minutos, para desativar a enzima. As amostras tratadas foram armazenadas em freezer a -20°C, até a síntese do cDNA.

### 4.2.4 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA, a partir do RNA total extraído, foi realizada com o kit *Superscript III Taq Platinum* (Invitrogen), segundo orientações do fabricante.

Resumidamente, em um microtubo de 600 µL, mantido em gelo, adicionou-se 1,0 µg de RNA total, 1 µL de Oligo $(dT)_{20}$ 50 µM e 1 µL de dNTP 10 mM. Os tubos foram incubados em bloco a 65°C por 5 minutos e colocados em gelo por pelo menos 1 minuto. Após esse período, adicionou-se 2 µL de tampão RT 10X, 4 µL de $MgCl_2$ 25 mM, 2 µL de dTT 0,1 M e 1 µL de RNase OUT a cada tubo. A reação foi homogeneizada e adicionou-se 1 µL de enzima transcriptase reversa (RT). Como controle negativo utilizou-se um tubo contendo os mesmos reagentes, porém substituindo-se a enzima RT por 1 µL de água DEPC. Os tubos foram incubados em bloco a 50°C por 50 minutos, seguido por outra incubação a 85°C por 5 minutos, para finalização da reação. Os tubos foram colocados, então, em gelo por pelo menos 1 minuto. A fita de RNA foi removida do híbrido RNA:cDNA com a adição de 1 µl de RNAse H, seguido por a incubação em bloco a 37°C por 20 minutos.

A seguir as amostras foram precipitadas em 1/10 do volume de acetato de sódio (NaOAc) 3M pH 5,2 e 2,5 o volume de etanol absoluto gelado, ressuspendidas em 50 µL de TE 1X pH 7,6 e armazenadas em freezer a -20°C.

### 4.2.5 Análise de PCR em tempo real (RT-PCR)

A quantificação relativa da expressão do gene da leptina (*LEP*) nos três depósitos de tecido adiposo estudados (mesentérico, perirenal e subcutâneo) foi realizada em equipamento

StepOne® (Applied Biosystems® - Life Technologies). A proteína ribossomal L19 (RPL19) foi utilizada como controle positivo e reações sem a presença de cDNA, como controle negativo. Foram utilizados *primers* específicos para os genes *LEP e RPL19*, desenhados para a análise de RT-PCR em *software* Primer Express 3.0 (*primers* LEP RT-PCR e RPL19), com base nas sequências da leptina bovina (EU313203.1) e do RPL19 (NM 174243.2), disponíveis no GenBank (Quadro 1).

Quadro 1 - Nome, sequência e fabricante dos *primers*

| Nome | Sequência* | Fabricante |
|---|---|---|
| LEP RT-PCR (F) | 5’ – AGGTCCAGGATGACACCAAAAC – 3’ | Invitrogen |
| LEP RT-PCR (R) | 5’ – TCCAAACCAGTGACCCTCTGT – 3’ | Invitrogen |
| LEP *Eco*RI (F) | 5’ – ATT**GAATTC**GTGCCCATCTGCAAGGTC – 3’ | Exxtend |
| LEP *Sal*I (R) | 5’ – ATT**GTCGAC**GCACCCGGGACTGAGGT – 3’ | Exxtend |
| RPL19 (F) | 5’ – AGGGTACTGCCAATGCTTTAATG – 3’ | Invitrogen |
| RPL19 (R) | 5’ – CATGTGGCGGTCAATCTTCTT – 3’ | Invitrogen |
| Fator α (F) | 5’ – TACTATTGCCAGCATTGCTGC – 3’ | Invitrogen |
| AOX 3’ (R) | 5’ – GCAAATGGCATTCTGACATCC – 3’ | Invitrogen |

* As sequências em destaque nos *primers* Lep *Eco*RI e LEP *Sal*I indicam os sítios de restrição das enzimas *Eco*RI e *Sal*I

Antes da análise, realizou-se uma PCR convencional, para testar os *primers* e verificar a ausência de contaminação com DNA genômico. As reações para a PCR em tempo real foram preparadas em triplicatas e continham 1 µL de cDNA; 10 µL de SYBR Green master mix 2X (Life Technologies); 0,25 mM de cada *primer*; e água miliQ autoclavada para um volume total de reação de 20 µL. O reagente SYBR Green máster mix é composto pelo corante SYBR Green, dNTPs, $MgCl_2$, tampão e AmpliTaq Gold® DNA polimerase. Os parâmetros utilizados no termociclador foram: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguida por 44 ciclos de desnaturação (94°C por 15 segundos) e anelamento/elongação (60°C por 1 minuto), uma curva de dissociação (de 65 a 95°C, com uma taxa de aquecimento de 0,3°C por ciclo), e um ciclo de resfriamento final a 4°C.

Uma curva de diluição com concentrações seriadas de cDNA foi calculada para obtenção da eficiência da amplificação dos genes *LEP* e *RPL19* em cada um dos três tecidos adiposos. A eficiência de amplificação (E) foi considerada como: $E = 2^{(-1/slope)}$. Alterações na expressão gênica foram calculadas pela quantificação relativa, através do método ΔΔCt

(LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), no qual Ct é o número do ciclo em que o sinal fluorescente do produto ultrapassa o limiar estabelecido na fase exponencial da PCR, e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{RPL19} - \Delta Ct_{LEP}$. Se o valor de E não foi diferente de 2, então a taxa de expressão do gene *LEP* (R) foi calculada como $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os dados normalizados foram transformados e apresentados como "vezes" em relação ao grupo controle (grupo B).

Antes de comparar a expressão gênica, é importante considerar e, se necessário, fazer ajustes para diferentes eficiências de amplificação do cDNA (YUAN et al., 2006). A análise de regressão resultou em coeficiente de regressão ($R^2$) acima de 0,95, indicando uma correlação linear entre a concentração inicial de cDNA e o Ct. Ao mesmo tempo, os *slopes* não foram significativamente diferentes de -1 (o intervalo de confiança do *slope* inclui o valor -1). Portanto, a eficiência de amplificação dos genes *LEP* e *RPL19* foi considerada igual a 100%. A expressão do gene controle (*RPL19*) não foi afetada pelo tratamento ($P$ = 0,38), demonstrando sua validade como gene referência para esse estudo.

### 4.2.6 Análise estatística

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos estruturados em classes, com quatro repetições por tratamento. Os dados de concentração sérica de leptina foram analisados pelo procedimento MIXED (SAS, 2000) para medidas repetidas no tempo, utilizando o modelo Y = tratamento + tempo + tratamento*tempo + μ + *e*, considerando tratamento, tempo e interação tratamento*tempo como fontes de variação. O dia foi considerado como variável repetida, e animal dentro do tratamento, como o sujeito. Para a análise da interação tratamento*tempo, utilizou-se uma regressão polinomial, avaliando os componentes linear, quadrático, cúbico e desvio do cúbico. Os dados da concentração sérica de leptina sofreram transformação logarítmica, para atender às regras de normalidade dos resíduos.

Os dados da PCR em tempo real, de expressão gênica, foram analisados em delineamento *split-plot*, utilizando o procedimento MIXED (SAS, 2000), considerando tratamento (A, B ou BL), depósito de tecido adiposo (mesentérico, perirenal ou subcutâneo) e a interação entre os dois como efeitos fixos; e considerando o animal dentro do tratamento como efeito aleatório.

Em todas as análises, considerou-se um nível de significância de 5%.

## 4.3 EXPERIMENTO 2

Para o experimento 2, selecionou-se aleatoriamente uma amostra de tecido adiposo subcutâneo de uma das novilhas do grupo de tratamento A, recebendo dieta de alta energia (descrito acima, no experimento 1). A extração do RNA total e a síntese do cDNA foram realizadas como descrito no experimento 1.

### 4.3.1 Amplificação do cDNA codificador da leptina bovina

Os *primers* utilizados para a amplificação do cDNA da leptina (Quadro 1) foram desenhados com base na sequência do mRNA da leptina bovina (NCBI Reference Sequence NM 173928.2), excluindo-se sua sequência sinalizadora de secreção nativa, uma vez que os vetores de expressão utilizados apresentam a sequência sinalizadora de secreção do *S. cerevisiae*, a sequência do Fator α.

Para que ocorra uma clonagem direcionada do inserto com o gene de interesse nos vetores de expressão, incluíram-se sítios de restrição das enzimas *Eco*RI e *Sal*I (Fermentas), nos *primers* senso (F) e antisenso (R), respectivamente. Três bases (ATT) foram incluídas antes dos sítios de restrição, segundo recomendação do fabricante das enzimas. Ambos os vetores de expressão permitem a adição de uma cauda de poli-histidina à extremidade C-terminal da proteína heteróloga, facilitando a posterior purificação da proteína secretada, que será feita em resina queladora de metais (USER MANUAL 25-0150; USER MANUAL 25-0174 - INVITROGEN). Assim, o *stop* códon nativo da leptina foi excluído.

A proteína ribossomal L19 (RPL19), expressa de forma constitutiva pelos tecidos, foi utilizada como controle positivo de amplificação. As sequências dos *primers* RPL19 estão apresentadas na quadro 1.

A reação de PCR foi preparada em volume final de 50 µL, utilizando 5 µL de tampão de PCR 10X; 1 µL de dNTP 10 mM; 3 µL de $MgCl_2$ 50 mM; 1,25 µL de *primer* LEP *Eco*RI ou RPL19 (F) 10 µM; 1,25 µL de *primer* LEP *Sal*I ou RPL19 (R) 10 µM; 0,25 µL de *Taq* (*Termophilus aquaticus*) DNA polimerase (Invitrogen); 1 µL de amostra de cDNA; e água MiliQ autoclavada para um volume total de 50 µL. Foi incluído um tubo controle, substituindo-se o cDNA por 1 µL de água MiliQ autoclavada. Utilizou-se termociclador

Veriti (Applied Biosystems), com a seguinte programação: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos; seguido por 44 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; e finalizado por 1 ciclo a 94°C por 1 minuto, 1 ciclo a 60°C por 30 segundos, 1 ciclo a 72°C por 1 minuto e permanecendo, então, a 4°C.

Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, utilizando TAE 1X como tampão, para purificação do produto de PCR. A purificação foi realizada com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). A banda de aproximadamente 456 pb, referente ao gene da leptina, foi recortada rapidamente do gel com uma lâmina de bisturi, evitando uma exposição prolongada do produto de PCR à luz UV do transiluminador, o que poderia comprometer a integridade do material recuperado. O fragmento de gel foi transferido para microtubo de 1,5 ml e o protocolo de purificação foi seguido de acordo com as recomendações do fabricante, sendo que para a etapa de eluição, utilizou-se 30 µL de água MiliQ autoclavada morna (aproximadamente 55°C). A minicoluna foi incubada a temperatura ambiente por 2 minutos, sendo em seguida centrifugada a 16.000 x *g* por 2 minutos.

O produto de PCR purificado foi quantificado em gel de agarose 1%.

### 4.3.2 Clonagem no vetor de propagação pTZ57R/T e transformação de bactérias *E. coli*

Foram utilizadas bactérias *E. coli* da cepa DH5α, que é comumente utilizada em biologia molecular. Tal cepa apresenta a mutação φ80*lacZ*ΔM15 e é *knock-down* para o gene *laq*$I^q$, permitindo a seleção dos clones transformados pela cor azul/branco em meio contendo X-GAL e IPTG.

O inserto é clonado na região do gene *LacZ* do vetor, região que codifica a enzima β-galactosidase, cuja expressão pode ser induzida pelo IPTG. A β-galactosidase degrada o substrato X-GAL, produzindo um precipitado de cor azul. Assim, se houver inserção do inserto no plasmídeo, o gene *LacZ* não estará intacto e a bactéria não produzirá a β-galactosidase, de forma que as colônias serão brancas, facilitando o reconhecimento dos clones recombinantes.

O vetor de propagação pTZ57R/T possui o gene de resistência à ampicilina, de modo que as colônias transformadas são selecionadas em meio contendo esse antibiótico.

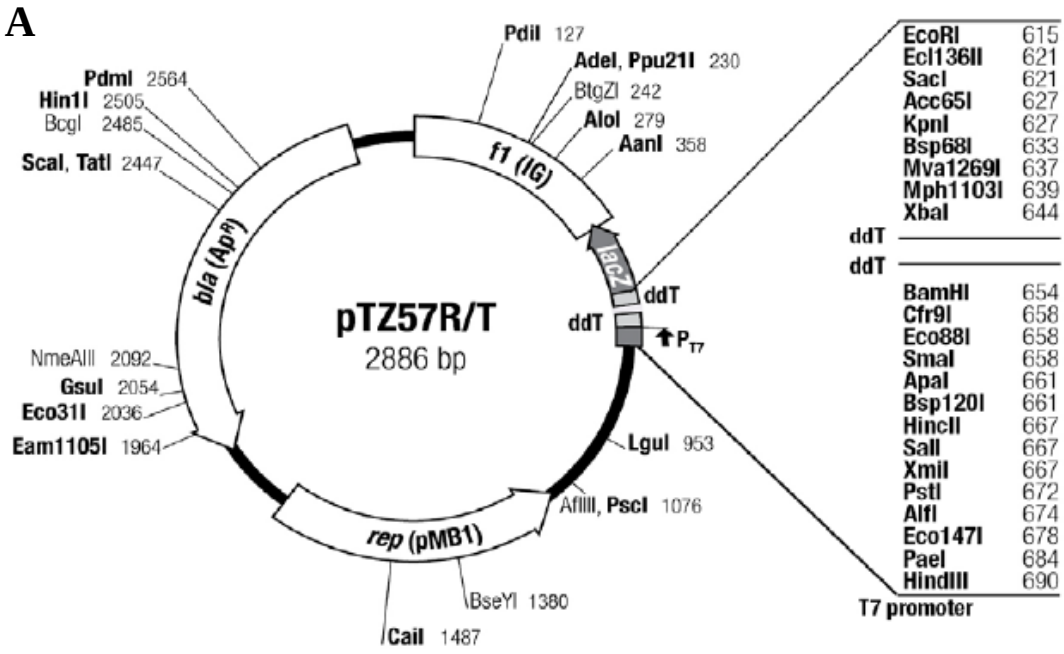
*4.3.2.1 Ligação*

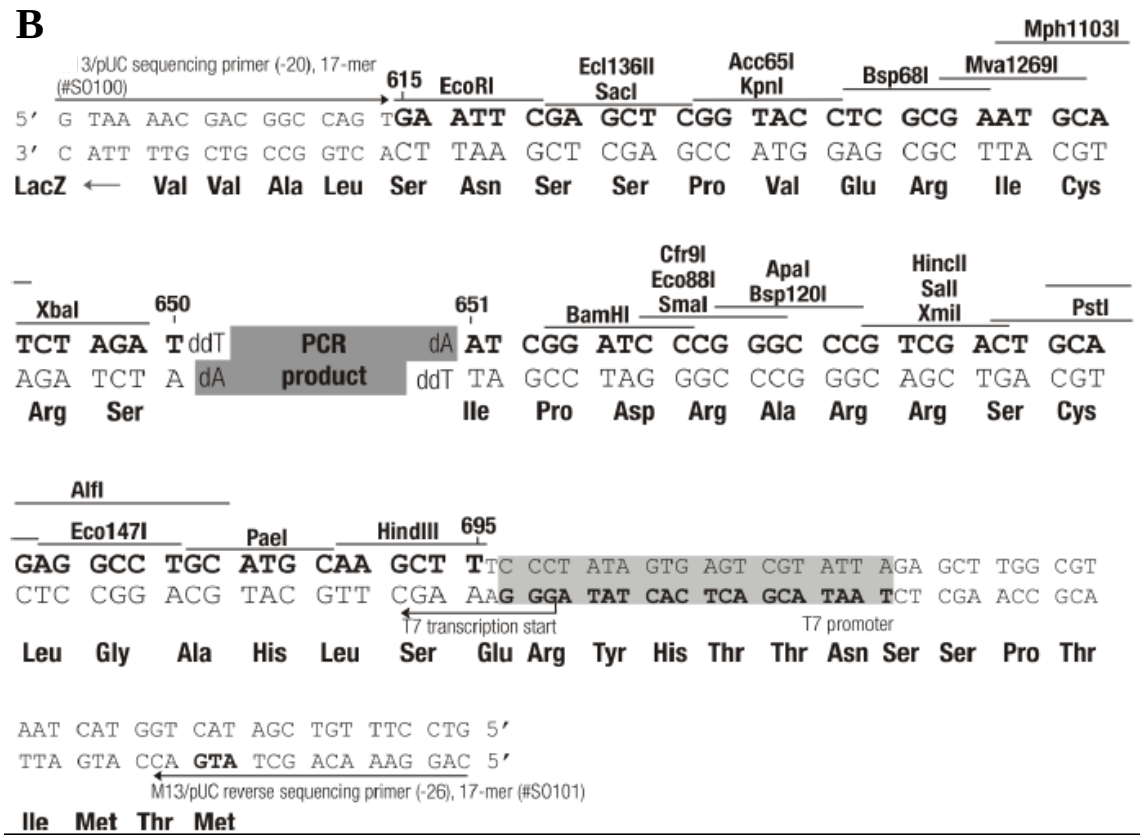
Para a ligação do produto de PCR no vetor pTZ57R/T (Figura 6), utilizou-se uma razão molar inserto:vetor de 3:1 em um volume de reação total de 20 µL. Os cálculos foram realizados através da fórmula abaixo, considerando uma quantidade de vetor de 55 ng (1 µl), tamanho do inserto de 456 pb e tamanho do vetor de 2886 pb (Figura 6).

$$\frac{quantidade\ vetor\ (ng) * tamanho\ inserto\ (Kb)}{tamanho\ vetor\ (Kb)} * razão\ molar\ \frac{inserto}{vetor} = quantidade\ inserto\ (ng)$$

A reação utilizou 4 µL de tampão de ligação 5X; 1 µL de vetor pTZ57R/T (55 ng/µL); 1 µL de enzima T4 DNA ligase; volume de inserto necessário para obter a razão molar vetor:inserto desejada; e água MiliQ autoclavada para volume total de 20 µL. Ao mesmo tempo foi realizado um controle positivo nas mesmas condições, porém utilizando 4 µL de Control PCR Fragment (42 ng/µL) (kit InsTAclone PCR Cloning – Thermo Scientific); e 10 µL água MiliQ autoclavada. As reações foram incubadas *overnight* (aproximadamente por 16 horas) em geladeira, resultando no plasmídeo pTZlep.

Figura 6 - A) Mapa do vetor de propagação pTZ57R/T; B) Sequência do sítio de clonagem múltipla (MCS)






Estão indicadas as enzimas de restrição que podem ser utilizadas para a clonagem

Fonte: adaptado de InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific)

### *4.3.2.2 Preparação de bactérias quimiocompetentes*

Primeiro as bactérias foram plaqueadas em meio LB Agar (sem antibiótico) e incubadas *overnight* em estufa a 37°C. No dia seguinte, transferiu-se uma colônia, selecionada aleatoriamente, para garrafa de 250 mL contendo 50 mL de meio LB líquido (sem antibiótico). A garrafa foi incubada em *shaker* a 37°C, 250 rpm até a cultura alcançar uma $OD_{600}$ de 0,3 a 0,4 (aproximadamente 12 horas).

Uma vez que a $OD_{600}$ foi atingida, a cultura foi rapidamente resfriada em gelo e transferida para tubos Falcon de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 4.000 x *g* por 10 minutos à 4°C e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de células foi, então, cuidadosamente ressuspendido, em gelo, em 15 mL de $MgCl_2$ 100 mM gelado. A solução foi centrifugada a 4.000 x *g* por 10 minutos à 4°C e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de células foi ressuspendido em 20 mL de $CaCl_2$ 100 mM gelado e a solução foi mantida em gelo por 20 minutos, agitando-se levemente o tubo a cada 3 minutos, para manter as células em

suspensão. Os tubos foram novamente centrifugados a 4.000 x *g* por 10 minutos à 4°C e o sobrenadante foi descartado. Por último, as células foram ressuspendidas em 2 mL de solução de $CaCl_2$ 85 mM contendo 15% de glicerol. Foram feitas alíquotas de 200 µl em microtubos de 1,5 mL, as quais foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C.

*4.3.2.3 Transformação*

No dia seguinte, duas alíquotas de 200 µL de bactérias *E. coli* DH5α quimicamente competentes, preparadas previamente pelo método do cloreto de cálcio (ver abaixo), foram transformadas por choque térmico, com 10 µL das reações de ligação (controle e pTZlep). De forma resumida, 10 µL das ligações foram adicionadas às alíquotas de *E. coli* e incubadas em gelo por 5 minutos, em banho-maria a 37°C por 90 segundos e novamente em gelo por no mínimo 1 minuto. Após o procedimento, adicionou-se 800 µL de meio LB líquido a cada microtubo, incubando-os em banho-maria a 37°C por mais 50 minutos. Plaqueou-se 200 µL de cada transformação em placas de Petri descartáveis com 15 mL de meio LB Agar contendo ampicilina (100 mg/mL) (Gibco), X-GAL 2% (40 µL) (USB) e IPTG 200 mM (50 µL) (Invitrogen). As placas foram incubadas *overnight* em estufa a 37°C, sendo observado o crescimento de várias colônias brancas e azuis.

Três colônias brancas da placa pTZlep foram escolhidas aleatoriamente e inoculadas em tubos Falcon de 50 mL contendo 5 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 mg/mL). Os pré-inóculos foram incubados *overnight* (aproximadamente 16 horas) em *shaker* a 37°C e 250 rpm, para realização de miniprep.

A miniprep das três colônias foi realizada com o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen), segundo instruções do fabricante, mas eluindo o DNA em 30 µL de água miliQ autoclavada morna (aproximadamente 55°C). O material eluído foi quantificado em gel de agarose 1%, mostrando uma concentração aproximada de 120 ng/µL.

*4.3.2.4 Análise de restrição*

Foi, então, realizada uma análise de restrição com as enzimas *Eco*RI e *Sal*I, para avaliar se o gene de interesse estava inserido corretamente no vetor e se os sítios de restrição

estavam íntegros. Foi realizada uma digestão dupla, utilizando o tampão 10X Buffer O, que permite atividade de 100% para ambas as enzimas, segundo indicações encontradas em www.thermoscientificbio.com. Para a reação utilizou-se: 1 µL de tampão O 10X; 0,5 µL de *Eco*RI (10 U/µL); 0,5 µL de *Sal*I (10 U/µL); 1 µL de DNA (120 ng/µL); e água miliQ autoclavada para um volume total de reação de 10 µL. A reação foi incubada a 37°C por 2 horas e avaliada em gel de agarose 1%.

### 4.3.3 Clivagem do plasmídeo pTZlep e dos vetores de expressão pPICZαA e pGAPZαA

A clivagem do plasmídeo pTZlep visou a obtenção do inserto com as extremidades corretas para ligação nos vetores de expressão, enquanto a clivagem dos vetores pPICZαA e pGAPZαA foi feita para linearização dos mesmos. O volume total das reações foi de 50 µL.

Para a reação de clivagem do plasmídeo pTZlep, utilizou-se 5 µL tampão O 10X; 1 µL enzima *Eco*RI (10 U/µL); 1 µL enzima *Sal*I (10 U/µL); 12,5 µL de DNA (120 ng/µL); e água miliQ autoclavada para volume total de 50 µL.

Para a clivagem do vetor pPICZαA, utilizou-se 5 µL tampão O 10X; 1 µL enzima *Eco*RI (10 U/µL); 1 µL enzima *Sal*I (10 U/µL); 16,0 µL de pPICZαA (90 ng/µL); e água miliQ autoclavada para volume total de 50 µL.

Para a clivagem do vetor pGAPZαA, utilizou-se 5 µL tampão O 10X; 1 µL enzima *Eco*RI (10 U/µL); 1 µL enzima *Sal*I (10 U/µL); 10 µL de pGAPZαA (150 ng/µL); água miliQ autoclavada para volume total de 50 µL.

As reações foram incubadas *overnight* em banho-maria a 37°C.

Após a clivagem, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1%, para purificação dos fragmentos de interesse. Os vetores pPICZαA e pGAPZαA apresentaram uma banda única de aproximadamente 3,6 kb e 3,1 kb, respectivamente, referentes aos vetores linearizados. O plasmídeo pTZ57lep apresentou duas bandas bem distintas: uma de aproximadamente 456 pb (referente ao inserto) e uma de aproximadamente 2,8 kb (referente ao fragmento do pTZ57R/T), sendo purificada a banda referente ao inserto. Os fragmentos foram recortados do gel de agarose e purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), como comentado anteriormente, sendo o inserto eluído em 20 µL de água miliQ autoclavada morna, e os vetores em 30 µL.

O material obtido das três purificações foi quantificado em gel de agarose 1% e todos os três fragmentos apresentaram concentração de aproximadamente 50 ng/µL.

### 4.3.4 Clonagem nos vetores de expressão pPICZαA e pGAPZαA e transformação de bactérias *E. coli*

Foi utilizada a mesma cepa de *E. coli* DH5α, preparada como descrito anteriormente.

Nos vetores de expressão a estratégia de clonagem foi realizada de forma que a leptina recombinante fosse expressa fusionada com uma cauda de polihistidina (contendo seis resíduos de histidina) na extremidade C-terminal, permitindo uma purificação simples da proteína recombinante, através da passagem do meio de cultura por uma coluna contendo resina queladora de metais. Além disso, a leptina recombinante foi expressa fusionada com o peptídeo sinal do fator α do *Saccharomyces cerevisiae* na extremidade N-terminal, de forma que a proteína fosse direcionada para a via secretória da célula.

Ambos os vetores possuem o gene *Sh ble* e, portanto, a seleção das colônias transformantes é feita em meio contendo o antibiótico Zeocina™, tanto na *E. coli* quanto na *P. pastoris*.

#### *4.3.4.1 Ligação*

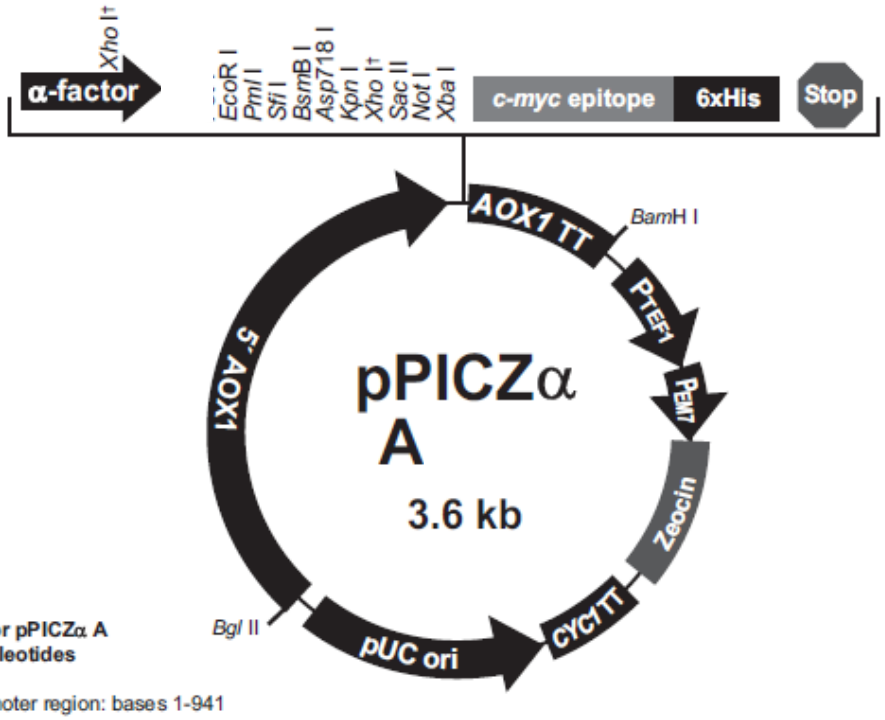
Os dois vetores de expressão escolhidos diferem quanto ao promotor utilizado e, portanto, quanto à forma de indução da expressão. O pPICZαA (Figura 7) utiliza o promotor do gene *AOX1*, que codifica uma álcool oxidase da via de metabolismo do metanol, de forma que a expressão da proteína heteróloga pela *Pichia* deve ser induzida com a adição de metanol no meio de cultura. Já o pGAPZαA (Figura 8) utiliza o promotor do gene *GAP*, que é um gene constitutivo e, portanto, não precisa de indução com metanol, tornando a produção da proteína heteróloga bem mais simples. Entretanto, ambos possuem sítios de clonagem múltipla (MCS) muito parecidos (Figuras 7 e 8), de forma que a estratégia de clonagem adotada foi a mesma tanto para o pPICZαA quanto para o pGAPZαA.

Para a ligação do inserto nos vetores de expressão utilizou-se uma relação molar inserto:vetor de 5:1, em um volume total de reação de 10 µL. O cálculo das quantidades de inserto e vetor foi feito através da fórmula citada acima.

Foram feitas duas reações, utilizando-se 2 µL de tampão de ligação 5X; 1 µL de vetor pPICZαA ou pGAPZαA (50 ng/µL); 0,75 µL de enzima T4 DNA ligase (1 U/µL); 1 µL de inserto (50 ng/µL); e água MiliQ autoclavada para volume total de 10 µL. As reações foram incubadas *overnight* (aproximadamente 16 horas) em geladeira, resultando nos plasmídeos pPICbLep e pGAPbLep.

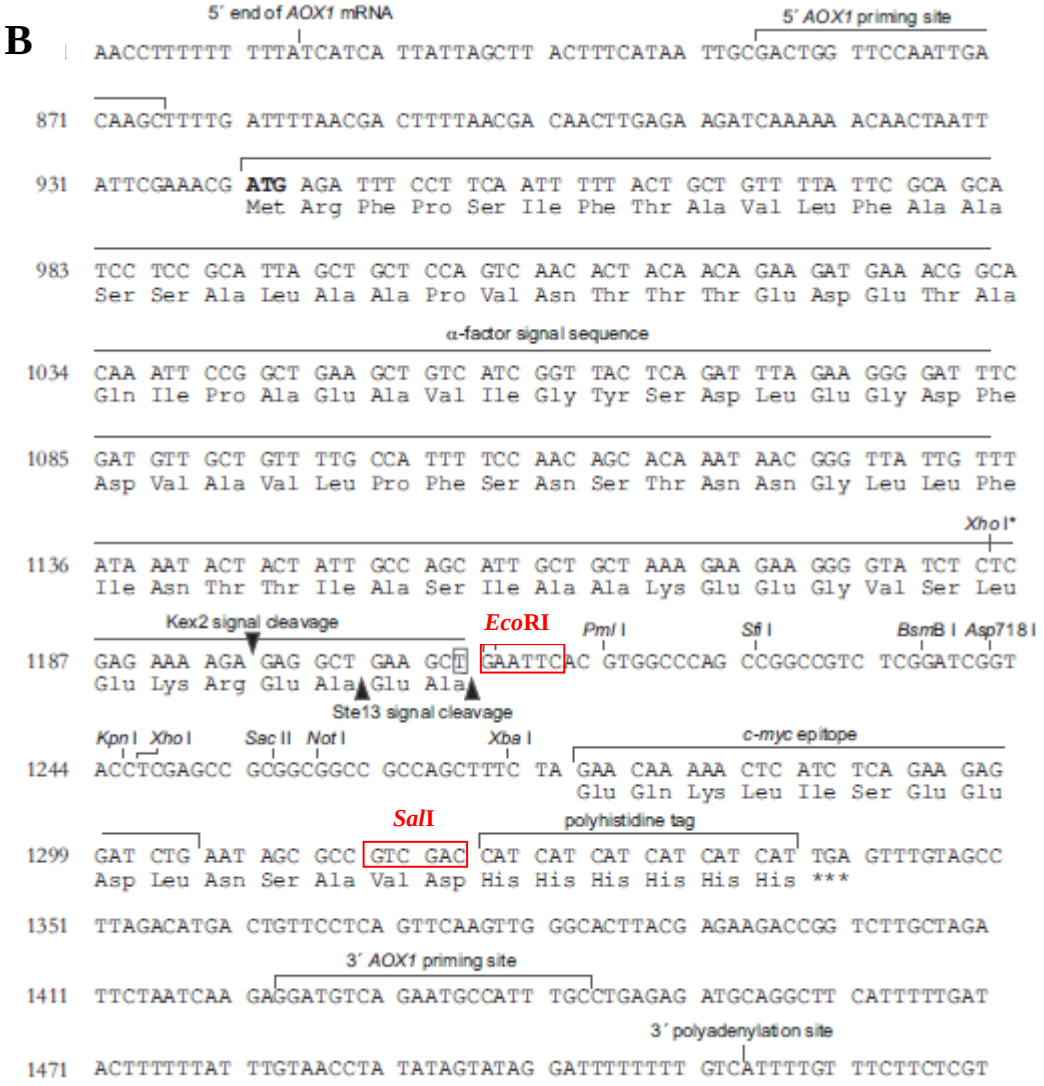
Figura 7 - A) Mapa do vetor de expressão pPICZαA; B) Sequência do sítio de clonagem (região MCS) do pPICZαA, com a localização dos sítios de restrição *Eco*RI e *Sal*I em destaque

**A**




**Comments for pPICZα A**
**3593 nucleotides**

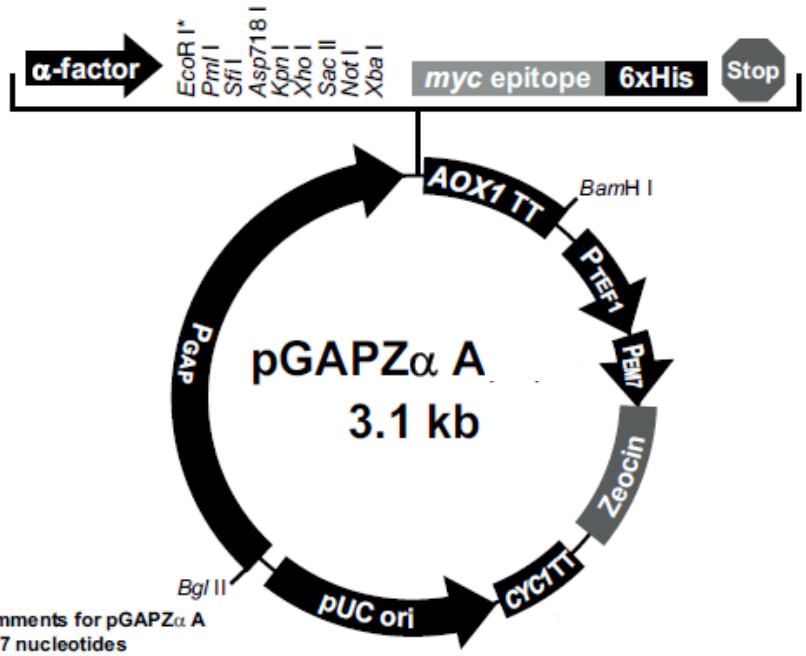
5´ *AOX1* promoter region: bases 1-941
5´ *AOX1* priming site: bases 855-875
α-factor signal sequence: bases 941-1207
Multiple cloning site: bases 1208-1276
*c-myc* epitope: bases 1275-1304
Polyhistidine (6xHis) tag: bases 1320-1337
3´ *AOX1* priming site: bases 1423-1443
*AOX1* transcription termination region: bases 1341-1682
*TEF1* promoter: bases 1683-2093
EM7 promoter: bases 2095-2162
*Sh ble* ORF: bases 2163-2537
*CYC1* transcription termination region: bases 2538-2855
pUC origin: bases 2866-3539 (complementary strand)




Fonte: adaptado de *Pichia* expression vectors for selection on Zeocin™ and purification of secreted, recombinant proteins (Invitrogen)

Figura 8 - A) Mapa do vetor de expressão pGAPZαA; B) Sequência do sítio de clonagem (região MCS) do pGAPZαA, com a localização dos sítios de restrição *Eco*RI e *Sal*I em destaque

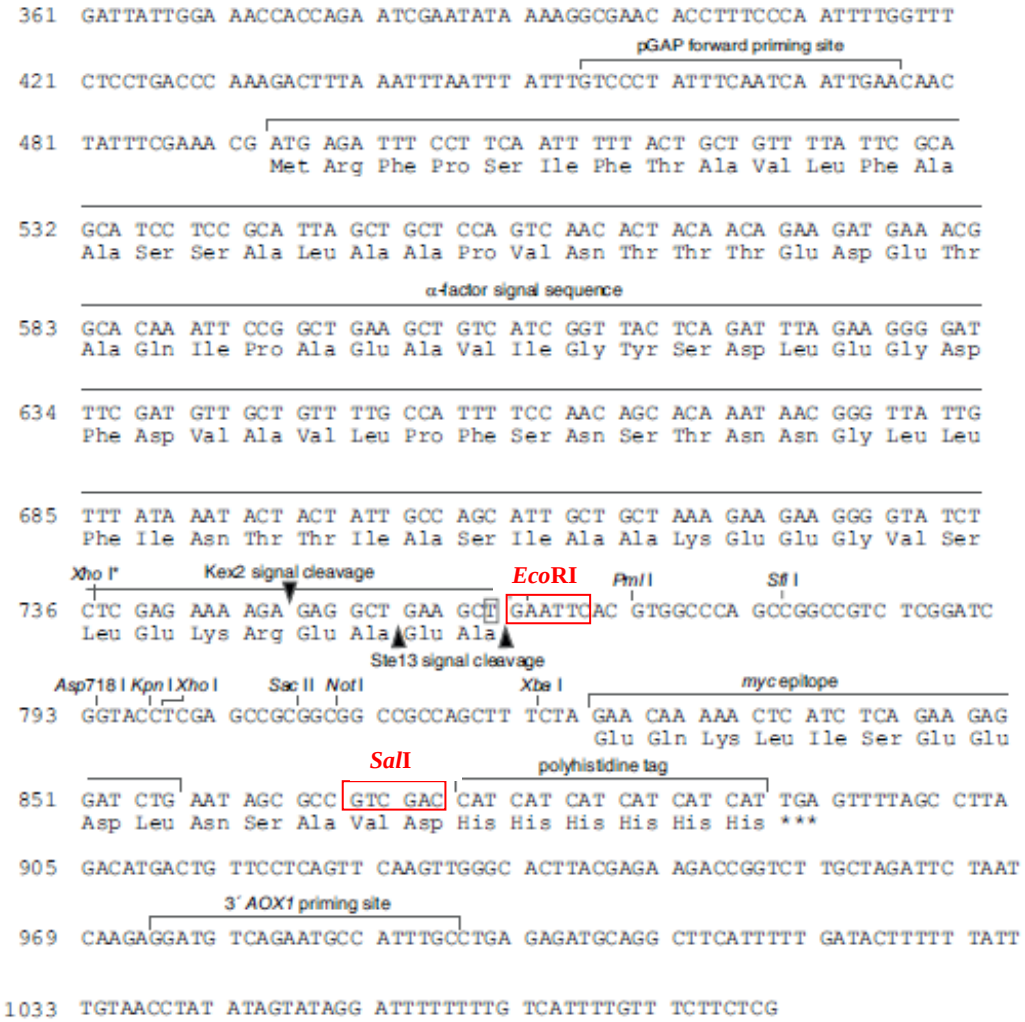
**A**




**Comments for pGAPZα A**
**3147 nucleotides**

*GAP* promoter region: bases 1-483
α-factor signal sequence: bases 493-759
Multiple cloning site: bases 760-828
*myc* epitope tag: bases 827-856
Polyhistidine tag: bases 872-889
*AOX1* transcription termination region: bases 893-1233
*TEF1* promoter region: bases 1234-1644
EM7 promoter: bases 1645-1712
*Sh ble* ORF: bases 1713-2087
*CYC1* transcription termination region: bases 2088-2405
pUC origin: bases 2416-3089

**B**




Fonte: adaptado de *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins (Invitrogen)

### *4.3.4.2 Transformação*

Alíquotas de 200 µL de bactérias *E. coli* DH5α quimicamente competentes, preparadas previamente pelo método do cloreto de cálcio (descrito anteriormente), foram transformadas por choque térmico, com 10 µL das reações de ligação. A transformação foi feita como descrito anteriormente. As transformações foram plaqueadas em placas de Petri descartáveis com 15 mL de meio LB Agar *low salt* contendo zeocina (25 µg/mL). Foram preparadas duas placas por transformação: em uma plaqueou-se 200 µL da transformação e na outra, primeiro centrifugou-se o restante da transformação a 1500 x *g* por 5 min, descartou-se o sobrenadante (meio), deixando apenas 100 µL, nos quais o pellet de células foi ressuspendido e plaqueado. As placas foram incubadas *overnight* em estufa a 37°C.

*4.3.4.3 PCR de colônia*

Algumas colônias foram escolhidas aleatoriamente de cada placa, para verificação da presença do inserto (colônias positivas) através de PCR de colônia, utilizando *primers* que anelam nos vetores: Fator α (F) e AOX 3' (R). Para as reações utilizou-se 2,5 µL de tampão de PCR 10X; 0,5 µL de dNTP 10 mM; 0,75 µL de $MgCl_2$ 50 mM; 0,5 µL de *primer* Fator α (F) 10 µM; 0,5 µL de *primer* AOX 3' (R) 10 µM; 0,25 µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água MiliQ autoclavada para um volume total de 25 µL. Encostou-se a ponta de um palito de dente autoclavado em cada colônia a ser testada, agitando-o a seguir no respectivo tubo de PCR contendo a reação. Foi incluído um tubo controle, contendo apenas os 25 µl da reação, sem a adição das bactérias.

Utilizou-se termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), com a seguinte programação: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos; seguido por 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; e finalizado por 1 ciclo a 72°C por 7 minutos, permanecendo então a 4°C.

Na eletroforese em gel de agarose 1%, foram consideradas como colônias recombinantes as que apresentaram banda de aproximadamente 650 pb (referente aos vetores com presença do inserto), sendo que o tamanho de banda esperado para os vetores sem a presença do inserto é de aproximadamente 300 pb.

Foram escolhidas, aleatoriamente, quatro colônias recombinantes de cada plasmídeo (pPICbLep e pGAPbLep) para preparo do pré-inóculo. As colônias foram inoculadas em tubo Falcon de 50 mL contendo 5 mL de meio LB *low salt* com zeocina (25 µg/mL), e incubadas *overnight* em *shaker* a 37°C, 250 rpm,. No dia seguinte foi realizada miniprep, como descrito anteriormente. O material recuperado foi quantificado em gel de agarose 1%, apresentando concentrações de aproximadamente 180 ng/µL e 80 ng/µL, para os plasmídeos pPICbLep e pGAPbLep, respectivamente.

*4.3.4.4 Análise de restrição*

A análise de restrição utilizou as enzimas *Eco*RI e *Sal*I em volume total de reação de 10 µL. Para as reações utilizou-se 1 µL de tampão O 10X; 0,5 µL de *Eco*RI (10 U/µL); 0,5

µL de *Sal*I (10 U/µL); 1 µL de DNA; e água miliQ autoclavada para um volume total de reação de 10 µL. A reação foi incubada em banho-maria a 37°C por 2 horas e avaliada em gel de agarose 1%.

Para confirmação da presença e da orientação correta do inserto nos vetores de expressão, foram realizadas também reações de PCR, utilizando um *primer* do vetor e um do inserto, sendo uma realizada com o par Fator α (F; do vetor) e LEP *Sal*I (R; do inserto), e a outra com o par LEP *Eco*RI (F; do inserto) e AOX 3' (R; do vetor). As reações de PCR foram preparadas em um volume total de 25 µL, utilizando 2,5 µL de tampão de PCR 10X; 1 µL de dNTP 10 mM; 3 µL de $MgCl_2$ 50 mM; 1 µL de *primer* F (Fator α ou LEP *Eco*RI) 10 µM; 1 µL de *primer* R (LEP *Sal*I ou AOX 3') 10 µM; 0,25 µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 1µL de DNA (miniprep); e água MiliQ autoclavada para um volume total de 25 µL.

A programação utilizada no termociclador foi: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos; seguido por 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 53°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e finalizado por 1 ciclo a 72°C por 7 minutos, permanecendo então a 4°C. O resultado das reações foi analisado em gel de agarose 1%.

### 4.3.5 Sequenciamento do fragmento contendo o gene de interesse

Antes de transformar a *Pichia*, os plasmídeos pPICbLep e pGAPbLep foram sequenciados em sequenciador MegaBACE 1000 Flexyble, utilizando o kit *DYEnamic ET Dye Terminator* (GE Healthcare), para confirmar se o clone era mesmo positivo e se a sequência estava correta. Os *primers* Fator α e AOX 3' foram utilizados para sequenciar as regiões 5' e 3', respectivamente.

### 4.3.6 Transformação das leveduras *Pichia pastoris* com os plasmídeos pPICbLep e pGAPbLep

Foram utilizadas leveduras *Pichia pastoris* da cepa KM71H.

A transformação ocorre com integração dos DNA linear no genoma da levedura por recombinação homóloga entre o DNA heterólogo e regiões homólogas do genoma, de forma a

gerar transformantes estáveis (CREGG et al., 1985; CREGG et al., 1989). O plasmídeo pGAPbLep foi integrado no *locus GAP*, enquanto o vetor pPICbLep foi integrado no *locus AOX1*.

*4.3.6.1 Linearização dos plasmídeos*

Após o sequenciamento, os plasmídeos foram linearizados com as enzimas *Pme*I e *Xma*JI (pPICbLep e pGAPbLep, respectivamente) para posterior transformação das leveduras *Pichia pastoris,* com integração dos plasmídeos ao genoma da levedura.

Para a linearização do pPICbLep utilizou-se 5 µL de buffer 10X; 3 µL de *Pme*I (5 U/µL); 20 µL de DNA (180 ng/µL); e água miliQ autoclavada suficiente para um volume total de 50 µL. Para a linearização do pGAPbLep utilizou-se 5 µL de buffer 10X; 1,5 µL de *Xma*JI (10 U/µL); 20 µL de DNA (80 ng/µL); e água miliQ autoclavada suficiente para um volume total de 50 µL. As reações foram incubadas *overnight* em banho-maria a 37°C e avaliadas em gel de agarose 1%, onde a presença de uma banda única demonstrou a correta linearização.

Os plasmídeos linearizados foram precipitados em 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 5,2; e 2,5 vezes o volume de etanol 100% gelado. Os tubos foram incubados a -80°C por no mínimo 15 minutos, sendo então centrifugados a 16.000 x *g* por 10 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com 500 µL de etanol 80% gelado. Os tubos foram novamente centrifugados a 16.000 x *g* por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi deixado para secar em temperatura ambiente por 5 a 10 minutos, sendo então ressuspendido em 10 µL de água miliQ autoclavada.

Após a precipitação, o material foi quantificado em gel de agarose 1%, apresentando concentração de aproximadamente 80 ng/µL, para ambos os plasmídeos.

*4.3.6.2 Preparo da Pichia eletrocompetente*

Foram utilizadas leveduras *Pichia pastoris* da cepa KM71H, que estavam em cultura no Laboratório de Biologia Molecular da UFSCar, em São Carlos. As leveduras competentes

não podem ser armazenadas e foram preparadas na hora, segundo protocolo adaptado de Cregg et al. (1993).

Durante a manhã foi preparado o pré-inóculo: uma quantidade de massa celular suficiente para cobrir a ponta de um palito de dente foi retirada da placa de cultura e inoculada em tubo Falcon de 50 mL contendo 5 mL de meio YEPD. O pré-inóculo foi incubado em *shaker* a 30°C, 250 rpm até o final da tarde (aproximadamente 9 horas).

Após o período de incubação do pré-inóculo (no fim da tarde do mesmo dia), foi preparado o inóculo. Foi feita a aferição da densidade óptica (DO) do pré-inóculo diluído 1:10 em água miliQ, que apresentou valor de 7,58. O cálculo da quantidade de pré-inóculo necessária para a preparação de 50 mL de inóculo com DO final de 1,4 foi feito segundo as fórmulas abaixo:

$$n = \frac{t}{td} \rightarrow n = \frac{16}{2} \rightarrow n = 8$$

Onde:

*t* = tempo de incubação do inóculo (aproximadamente 16 horas)

*td* = tempo de divisão das células (para *Pichia*, considera-se 2 horas)

$$N = N_0 * 2^n \rightarrow 1{,}4 = N_0 * 2^8 \rightarrow N_0 = 0{,}0055$$

Onde:

*N* = DO do inóculo desejada no final (entre 1,0 e 1,5, sendo que utilizamos 1,4 para os cálculos)

$N_0$ = concentração de células inicial no inóculo

$$Volume\ de\ inóculo\ em\ \mu L = \frac{(N_0 * Volume\ do\ inóculo\ em\ \mu L)}{DO\ pré - inóculo}$$

$$Volume\ de\ inóculo = \frac{0{,}0055 * 50000}{7{,}58}$$

Desta forma, para a preparação do inóculo, transferiu-se 36 µL de pré-inóculo para erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio YEPD. O frasco foi tampado com gaze e incubado em shaker a 30°C, 250 rpm por 16 horas (valor de *t* utilizado para os cálculos acima).

No dia seguinte, o inóculo foi retirado do *shaker* e mantido em gelo. A DO do inóculo (*N*) foi aferida em espectrofotômetro com diluição de 1:10 em água miliQ, para conferir se está entre 1,0 e 1,5. Todo o volume de inóculo foi, então, transferido para garrafa autoclavada e centrifugado a 1.500 x *g* e 4°C por 5 minutos. O sobrenadante (meio) foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspendido, em gelo, em 10 mL de solução preparada na hora de 10 mL de meio YEPD e 2 mL de HEPES 1M pH 7,0. Após a ressuspensão do *pellet*, adicionou-se 250 µL de DTT 1M. A solução foi homogeneizada e incubada em estufa a 30°C por 15 minutos.

Após a incubação, adicionou-se água miliQ gelada para um volume de 50 mL, e foi feita nova centrifugação a 1.500 x *g* e 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspendido em 25 mL de água miliQ gelada. A solução foi centrifugada a 1.500 x *g* e 4°C por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi, então, ressuspendido em 2 mL de sorbitol 1M gelado. A solução foi transferida para tubo Falcon de 50 mL e centrifugada a 1.500 x *g* e 4°C por 5 minutos. Após descartar o sobrenadante, o *pellet* foi ressuspendido em 100 µL de sorbitol 1M gelado. Em microtubos de 1,5 mL, foram feitas alíquotas de 40 µL, as quais foram mantidas em gelo para transformação imediata (a *Pichia* competente não pode ser armazenada para transformação em dias subsequentes).

*4.3.6.3 Transformação*

A transformação foi feita por eletroporação em eletroporador BioRad Gene Pulser II, utilizando 500 ng a 1,0 µg de DNA. Assim, a cada alíquota de *Pichia* adicionou-se 9 µL de plasmídeo linearizado (80 ng/µL). Os tubos foram homogeneizados levemente e incubados em gelo por 5 minutos.

Logo em seguida prosseguiu-se com a eletroporação em cubeta de 2 mm, utilizando-se 1,5 kV; 25 µF; e 200 Ω. Imediatamente após o pulso, adicionou-se 1 ml de sorbitol 1M gelado

e transferiu-se as células para tubos Falcon de 15 mL, os quais foram incubados em estufa a 30°C por 2 horas.

Cada uma das transformações foi plaqueada em duas placas de Petri descartáveis contendo 15 mL de meio YEPD com duas concentrações de zeocina (100 µg/mL e 500 µg/mL). Nas placas com 100 µg/mL de zeocina plaqueou-se 100 µl da transformação, enquanto nas placas com 500 µg/mL de zeocina plaqueou-se 200 µl da transformação. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 4 dias.

#### *4.3.6.4 PCR de colônia*

Doze colônias foram escolhidas aleatoriamente para a realização de reação de PCR e consequente identificação de colônias recombinantes. Antes da realização da PCR, as células foram lisadas, sendo que as colônias selecionadas foram "picadas" em 20 µL de SDS 0,2% preparado na hora e aquecidas em banho-maria a 90°C por 3 minutos. As células foram centrifugadas por 30 segundos a 16.000 x *g* e 1 µL do sobrenadante foi utilizado para a PCR de colônia.

A reação de PCR ocorreu em volume total de 25 µL, utilizando 2,5 µL de tampão de PCR 10X; 1 µL de dNTP 10 mM; 3 µL de $MgCl_2$ 50 mM; 1,25 µL de Triton X100 20% preparado na hora; 1 µL de *primer* LEP *Eco*RI (F) 10 µM; 1 µL de *primer* AOX 3' (R) 10 µM; 0,25 µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 1µL de DNA (sobrenadante); e água MiliQ autoclavada para um volume total de 25 µL.

A programação utilizada no termociclador foi: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos; seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1,5 minutos e extensão a 72°C por 4 minuto; e finalizado por 1 ciclo a 72°C por 7 minutos, permanecendo então a 4°C. O resultado das reações foi analisado em gel de agarose 1%.

As colônias identificadas como recombinantes foram então utilizadas para avaliação da expressão da leptina recombinante.

### 4.3.7 Avaliação da expressão da leptina recombinante bovina em pequena escala

Dentre as colônias de *Pichia* recombinantes, 22 foram selecionadas aleatoriamente de cada placa (pPICbLep e pGAPbLep), para análise da expressão de bLeptina em pequena escala, utilizando placa de cultura de 24 poços (Whatman). Foram incluídos controles positivos e negativos. O controle negativo foi a *Pichia* cepa KM71H não transformada. Para o controle positivo utilizaram-se duas culturas de *Pichia* já existentes no Laboratório de Biologia Molecular da UFSCar, que conhecidamente produzem sugarina 2 (controle positivo do pPICbLep) e endoglucanase 3 (controle positivo do pGAPbLep) em altos níveis.

A análise da presença da leptina recombinante no meio de cultura foi realizada em SDS-PAGE 15%, corado com Coomassie blue (SAMBROOK et al., 2001).

#### *4.3.7.1 pPICbLep*

As 22 colônias recombinantes pPICbLep selecionadas foram inoculadas em meio BMGY (meio de crescimento) e cultivadas em *shaker* a 28°C e 250 rpm, por 2 dias. No primeiro poço da placa, inoculou-se o controle positivo (clone produtor de sugarina 2) e no último, o controle negativo (cepa KM71H não transformada).

Após o período de crescimento, a placa foi centrifugada a 1.500 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 2 ml de meio BMMY (meio de indução) e 15 µl de metanol 100% (0,75% do volume).

A placa foi cultivada em *shaker* a 28°C e 250 rpm, por 144 horas, sendo que à cada 24 horas a placa era centrifugada a 1.500 x *g* por 5 minutos, para coleta de alíquota de 200 µl de sobrenadante, que foi armazenada em microtubos de 1,5 ml, em freezer -20°C. Assim, as alíquotas foram retiradas nos tempos 0; 24; 48; 72; 96; 120; 144 h. Após a coleta de cada alíquota, adicionou-se 0,75% do volume restante no poço de metanol 100%.

#### *4.3.7.2 pGAPbLep*

As 22 colônias recombinantes pGAPbLep selecionadas foram inoculadas em 2 ml de meio YPD. No primeiro poço da placa, inoculou-se o controle positivo (clone produtor de

endoglucanase 3) e no último, o controle negativo (cepa KM71H não transformada). A placa foi cultivada em *shaker* a 28°C e 250 rpm, por 96 horas.

A cada 24 horas, a placa foi centrifugada a 1.500 x *g* por 5 minutos, para coleta de alíquota de 200 µl de sobrenadante, que foi armazenada em microtubos de 1,5 ml, em freezer -20°C. As coletas foram, então, realizadas nos tempos: 0; 24; 48; 72; 96 h.

# 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1 EXPERIMENTO 1

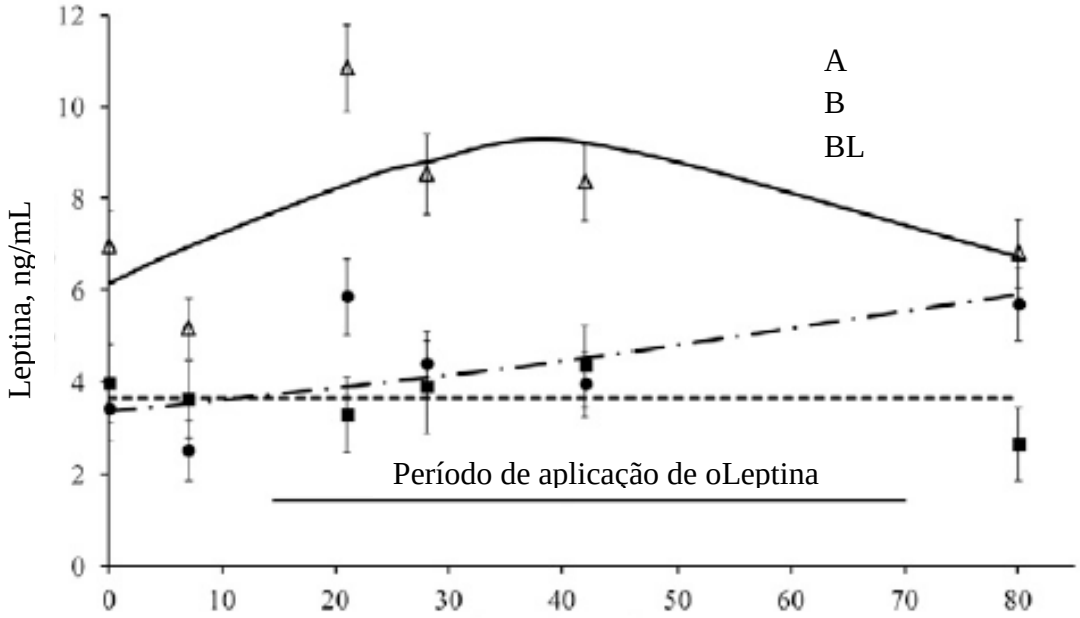
### 5.1.1 Concentração sérica de leptina

O desenvolvimento de ensaios para determinação da leptina sérica, específicos para ruminantes, ainda não progrediu muito, principalmente devido à baixa imunogenicidade da leptina de ruminantes, que dificulta a obtenção de anticorpos específicos (CHILLIARD et al., 2005). Os primeiros resultados publicados sobre a dosagem de leptina nesses animais utilizaram um kit de radioimunoensaio (RIA) comercial multi-espécie (Linco) (CHILLIARD et al., 1998), entretanto os resultados eram subestimados, quando comparados com RIAs específicos para ruminantes. Ehrhardt et al. (2000) observaram que os kits multi-espécie, além de gerarem resultados subestimados, não detectaram resposta na concentração de leptina de bovinos e ovinos em resposta a alterações nutricionais. Dessa forma, nesse experimento optou-se pela utilização de um kit ELISA específico para leptina bovina, uma vez que ainda não há RIAs específicos para leptina bovina disponíveis comercialmente.

Para avaliar se a dose de leptina aplicada foi capaz de aumentar a concentração sérica de leptina dos animais tratados acima do grupo controle, amostras de sangue de quatro novilhas de cada grupo foram aleatoriamente selecionadas para dosagem hormonal.

A administração de leptina recombinante ovina, na dosagem de 4,8 µg oLeptina/kg PV a cada 12 horas, aumentou a concentração sérica de leptina de novilhas Nelore pré-púberes recebendo dieta de baixa energia (grupo BL), sendo observado efeito de interação tratamento*tempo ($P$ = 0,04) (Figura 9). A leptina sérica das novilhas no grupo BL apresentou um pico (11,1 ± 1,4 ng/mL) no dia 21 do experimento, ou seja, sete dias após o início do tratamento hormonal. Daí em diante, a concentração de leptina sofreu uma redução para 9,4 ± 1,5 ng/mL no dia 28 de experimento (14 dias após o início do tratamento hormonal), e para 7,5 ± 1,4 ng/mL no dia 80 de experimento (11 dias após a primeira injeção de oLeptina).

Figura 9 - Análise de regressão da concentração sérica de leptina no tempo, do início do tratamento nutricional (dia 0) até 11 dias após o final da aplicação subcutânea de oLeptina ( dia 80)




A leptina foi aplicada duas vezes por dia, do dia 14 ao dia 69. A) dieta de alta energia (●) [Log(leptina) = 1,75 + 0,01 * DEE ($P$ = 0,04, $R^2$ = 0,12)]; B) dieta de baixa energia (■) [Log(leptina) = 1,86]; BL) dieta de baixa energia + oLeptina 4,8 µg/kg PV (Δ) [Log(leptina) = 2,62 + 0,027 * DEE – 0,0003 * $DEE^2$ ($P$ = 0,03, $R^2$ = 0,10)]. DEE = dias em experimento

A interação observada entre tratamento e tempo, demonstra que a concentração sérica de leptina foi afetada pelo tempo nos grupos A e BL ($P$ < 0,01), mas não no grupo B ($P$ = 0,50), no qual permaneceu constante (4,0 ± 2,0 ng/mL) durante todo o período de avaliação (Figura 9). Por outro lado, a leptina sérica do grupo recebendo dieta de alta energia (A), aumentou linearmente no tempo ($P$ = 0,004), enquanto o grupo BL apresentou efeito quadrático ($P$ = 0,01).

Garcia et al. (2002), avaliando 42 novilhas com 7 a 9 meses de idade, PV inicial de 292 ± 3,2 kg e GMD de 1,1 ± 0,01 kg PV/dia, semelhante grupo de alto consumo de energia (grupo A) do presente estudo, observaram aumento linear significativo do PV, da expressão do RNAm da leptina e da concentração de leptina sérica com o aproximar da puberdade. Segundo os autores, a concentração sérica de leptina passou de 3,8 ± 0,4 ng/ml, 16 semanas antes da puberdade, para 6,4 ± 0,4 ng/ml, na semana da puberdade, o que pode ter ocorrido tanto pelo aumento no número de células do tecido adiposo, devido ao alto GMD, quanto pela maior expressão do gene *LEP* no tecido adiposo.

A dose de leptina considerada ideal para estudos em novilhas seria aquela necessária para elevar a leptina sérica dos animais tratados para 5 a 10 ng/ml por um período de 8 a 12 horas após uma única injeção (MACIEL et al., 2004a). O critério utilizado baseia-se na observação de que vacas de corte maduras, ciclando normalmente, apresentam concentração sérica de leptina entre 15 e 20 ng/ml e que a concentração de leptina sérica na semana de ocorrência da puberdade de novilhas ganhando 1,1 kg PV/dia foi de 6,4 ± 0,4 ng/ml (GARCIA et al., 2002), de modo que a concentração alvo representa níveis fisiológicos de animais bem nutridos, ciclando normalmente.

A dose de leptina utilizada (4,8 µg/kg PV, duas vezes ao dia, ou seja, 9,6 µg/kg PV por dia) foi escolhida com base em estudo prévio de Maciel et al. (2004a), no qual a administração crônica de oLeptina em novilhas, em dose de 38,4 µg/kg PV/dia por 40 dias, gerou um aumento linear na concentração sérica de leptina dos animais tratados, alcançando valores até 35 vezes maiores que os animais não tratados, entretanto, ao contrário do esperado, não adiantou a ocorrência da puberdade. Desta forma, optou-se por utilizar a menor dose capaz de aumentar a concentração sérica de leptina de forma significativa, acima do valor observado para animais não tratados.

Houve um claro aumento na leptina sérica após o início do tratamento com oLeptina, o qual foi acompanhado por um aumento no diâmetro do folículo dominante, porém não determinou o adiantamento da puberdade das novilhas tratadas, como demonstrado anteriormente por Carvalho (2009). Entretanto, ambos os efeitos (na concentração de leptina e no diâmetro do FD) foram transitórios. O diâmetro do FD foi maior para o grupo BL até o dia 30 de experimento, comparado com o grupo controle (B), coincidindo com o tempo aproximado em que a leptina sérica começou a declinar no grupo BL.

A presença de receptores de LH na superfície de células da granulosa é um fator característico dos folículos pré-ovulatórios, e necessário para a continuidade de seu desenvolvimento (WEBB et al., 2004). Já foi demonstrado que a leptina regula a secreção de LH em bovinos (AMSTALDEN et al., 2003; KADOKAWA et al., 2006) e pode estimular o crescimento folicular indiretamente, ao induzir a secreção de LH pela hipófise anterior. Além do efeito central, a expressão do receptor de leptina em folículos pré-ovulatórios, assim como a presença de leptina em oócitos maduros, sugere que tal hormônio apresente, também, um efeito local no ovário (SARKAR et al., 2009).

O efeito transitório da leptina no diâmetro do FD pode ser explicado por diversos fatores, incluindo a ocorrência de *downregulation* dos receptores de LH nas células da granulosa (MONTANO et al., 2009); o desenvolvimento de resistência intracelular à leptina,

através do aumento na expressão de SOCS3 (MYERS et al., 2008); ou a saturação do sistema de transporte de leptina pela barreira hemato-encefálica (BANKS, 2004).

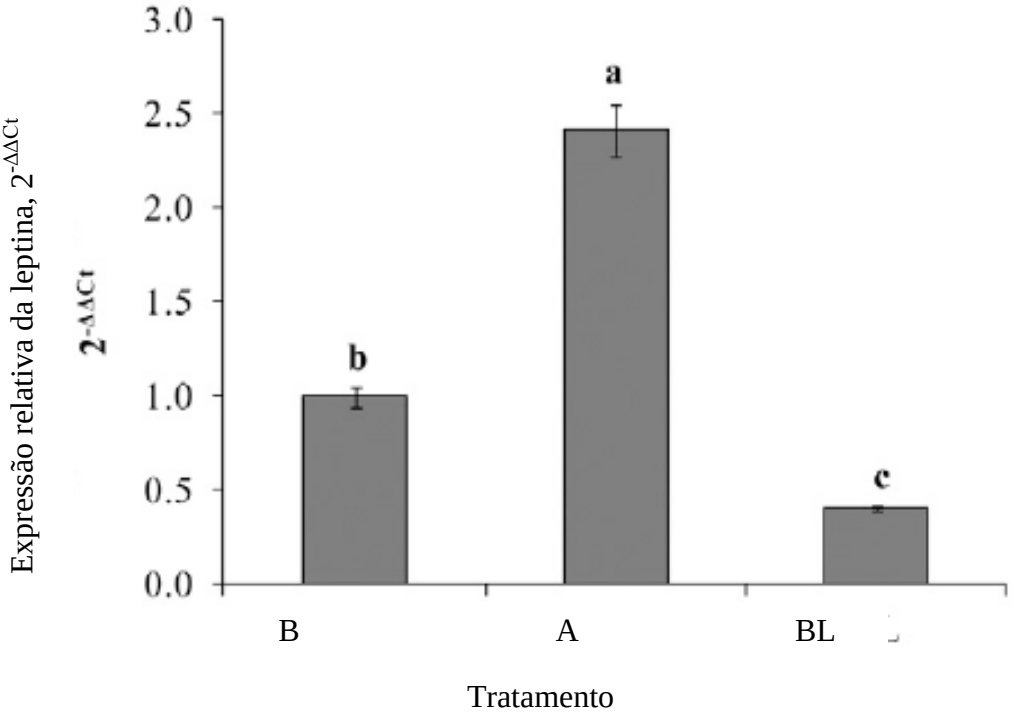
### 5.1.2 Expressão do gene *LEP* no tecido adiposo

A dieta de alta energia aumentou, enquanto a administração de oLeptina por 56 dias diminuiu a expressão do gene *LEP* no tecido adiposo ($P < 0,001$) (Figura 10). Não houve interação entre tratamento e depósito de tecido adiposo estudado ($P = 0,39$), indicando que os efeitos da nutrição e da leptina exógena na expressão do gene *LEP* foram semelhantes nos diferentes depósitos (mesentérico, perirenal e subcutâneo).

Ji et al. (1998), estudando a expressão de leptina bovina, também não observaram diferença na expressão nos diversos depósitos de tecido adiposo (subcutâneo, perirenal e omental), enquanto Kim et al. (2000) relataram maior nível de mRNA de leptina no tecido adiposo perirenal de bovinos, nível moderado nos tecidos adiposos abdominal, subcutâneo e intermuscular, e níveis baixos no tecido adiposo intramuscular.

A dieta de alta energia, em média, aumentou a expressão do gene *LEP* em 2,4 vezes, enquanto a aplicação de leptina exógena reduziu sua expressão, em média, 2,5 vezes, comparando com as novilhas controle (grupo B).

Figura 10 - Efeito de dieta e da leptina ovina exógena (oLeptina) na expressão do gene *LEP*




Dados apresentados como média ± SEM para os três tratamentos (B = dieta de baixa energia; A = dieta de alta energia; BL = dieta de baixa energia + oLeptina 4,8 µg/kg PV). Dados analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde Ct representa o número do ciclo limiar, tendo o grupo B como ponto de referência. Diferenças significativas ($P < 0,05$) estão representadas por letras diferentes

O decréscimo observado na expressão do gene *LEP* pode explicar a redução na concentração sérica de leptina, que ocorreu após 30 dias de tratamento hormonal (Figura 9), nas novilhas do grupo BL, e consequentemente a falha do tratamento em continuar a estimular o desenvolvimento folicular, acelerando a ocorrência da puberdade (CARVALHO, 2009).

As novilhas foram abatidas, em média, 41 dias após o final da aplicação de oLeptina, com apenas um animal sendo abatido durante o tratamento hormonal. O efeito residual da aplicação de oLeptina na expressão gênica é surpreendente, mas está de acordo com estudos prévios, que relataram um efeito de longo prazo do tratamento com leptina em animais jovens (PICO et al., 2007). O tratamento com leptina durante a lactação reduziu a expressão gênica no tecido adiposo de ratos adultos, além de alterar a expressão de genes hipotalâmicos (PICO et al., 2007). O mecanismo dessa programação da expressão gêncica, observada em animais jovens, ainda não é conhecido. Em estudo subsequente, o aumento da expressão hipotalâmica de POMC, em animais tratados com leptina, foi associado com o aumento da metilação dos

promotores POMC, sendo que não houve alteração na metilação de outros promotores, cuja expressão gênica foi alterada em animais tratados com leptina (PALOU et al., 2011).

Foi demonstrado, em ruminantes, que a hiperleptinemia está associada com uma redução na secreção de glicocorticoides e insulina, e como ambos são estimuladores da secreção de leptina, a hiperleptinemia pode inibir a secreção de leptina pelos adipócitos (CHILLIARD et al., 2001). Entretanto, foi demonstrado em ratos, que a administração de leptina reduziu a expressão de leptina no tecido adiposo branco, sem alterar a concentração de insulina ou corticosteroides (SCARPACE et al., 1998), sugerindo um *feedback* direto entre receptores de leptina e adipócitos.

Por outro lado, Vaiciunas (2007), trabalhando com novilhas zebuínas geneticamente precoces e não precoces, observaram que um dos mecanismos envolvidos na precocidade sexual, foi a maior expressão de leptina pelo tecido adiposo, além de menor expressão de receptores de NPY no hipotálamo.

## 5.2 EXPERIMENTO 2

Atualmente há apenas dois trabalhos na literatura sobre a expressão de leptina em leveduras *Pichia pastoris*: o publicado por Laborde et al. (2004), sobre a produção de leptina ovina; e o publicado por Liu et al. (2002), sobre a produção de leptina humana, ambos utilizando o promotor do gene *AOX1*. Já o número de trabalhos publicados sobre a expressão de leptina em bactérias *Escherichia coli* é substancialmente maior: Fawsi et al. (1996); Gertler et al. (1998); Guizes et al. (1998); Ji et al. (1998); Jeong et al. (1999); Iwase et al. (2000); Park et al. (2001); Jeong et al. (2004); Murashita et al. (2008) e Li et al. (2010); por exemplo.

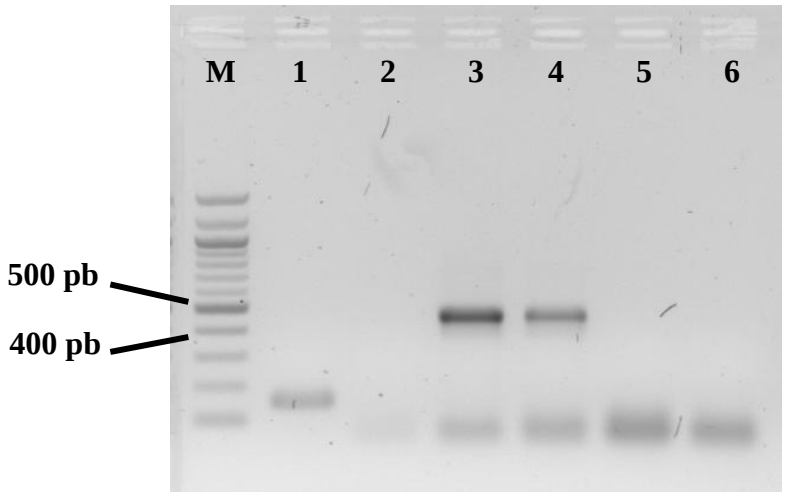
A *E. coli* é o organismo mais utilizado mundialmente para a produção de proteínas recombinantes, porém apresenta inúmeros problemas na recuperação de níveis substanciais de proteínas com a correta conformação espacial e atividade biológica. A expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* frequentemente ocorre pela produção de corpos de inclusão, a partir dos quais as moléculas de proteína biologicamente ativas só podem ser obtidas com o emprego de métodos muito trabalhosos e caros de purificação, e mesmo assim, o rendimento é baixo, principalmente devido à agregação das proteínas, resultado de interações entre suas regiões hidrofóbicas (CHOI; LEE, 2004).

O presente trabalho utilizou dois vetores de expressão muito parecidos, porém com promotores diferentes: o pPICZαA, que utiliza o promotor do gene *AOX1* e, portanto, necessita de metanol como única fonte de carbono para a indução da expressão; e o pGAPZαA, que utiliza o promotor do gene *GAP*, expresso constitutivamente, não necessitando de indução para a expressão. Vetores utilizando o promotor do *GAP* são mais interessantes para a produção de proteínas em larga escala, pois não apresentam o alto risco e custo com o emprego e armazenamento de grandes volumes de metanol, além de serem mais simples de trabalhar, pois não precisam de trocas de meio de cultura (de crescimento para de indução) ou de suplementações diárias com metanol (VASSILEVA et al., 2001). Alguns autores relatam maiores níveis de expressão de algumas proteínas heterólogas com o promotor *GAP* (DÖRING et al., 1998; DELROISSE et al., 2005), enquanto outros observaram maior eficiência com o promotor *AOX1* (SEARS et al., 1998; BOER et al., 2000; VASSILEVA et al., 2001). Assim, nesse estudo, optou-se por trabalhar também com o pPICZαA.

### 5.2.1 Amplificação e clonagem

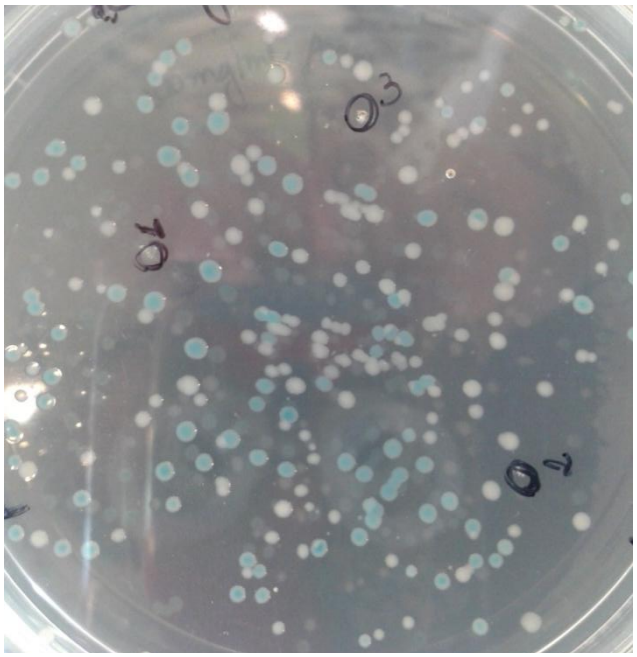
A sequência codificadora do gene da leptina bovina foi amplificada com sucesso por PCR, produzindo uma banda única de aproximadamente 456 pb no gel de agarose, referente ao gene da leptina sem a sequência sinal de secreção nativa e com inserção dos sítios de restrição *Eco*RI e *Sal*I (Figura 11). O inserto foi clonado no vetor de propagação pTZ57R/T e transformado em bactérias *E. coli* DH5α, produzindo diversas colônias recombinantes (brancas) (Figura 12).

Figura 11 - Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose a 1%




M) Marcador molecular (100 pb); 1) produto de PCR com *primers* RPL19; 2) controle RPL19; 3 e 4) produtos de PCR com *primers* LEP; 5) controle LEP; 6) controle negativo

Figura 12 - Bactérias *E.coli* DH5α transformadas com o plasmídeo pTZlep, em meio LB Agar com ampicilina (100 µg/mL)

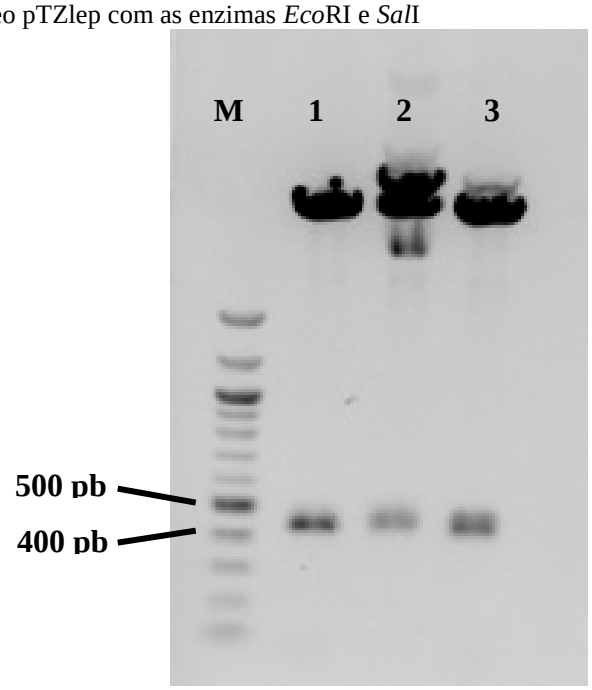


As colônias brancas são recombinantes (possuem o plasmídeo pTZlep). As colônias azuis apresentam o vetor pTZ57R/T sem inserção do produto de PCR

Três colônias recombinantes foram escolhidas aleatoriamente para análise de restrição e as três apresentaram resultado positivo, com duas bandas bem definidas no gel de agarose 1%, sendo uma de aproximadamente 2,8 kb (vetor pTZ57R/T) e outra de cerca de 456 pb (gene da leptina), indicando que os sítios de restrição estavam íntegros, criando extremidades

compatíveis com as extremidades criadas no inserto, com a adição dos mesmos sítios. (Figura 13).

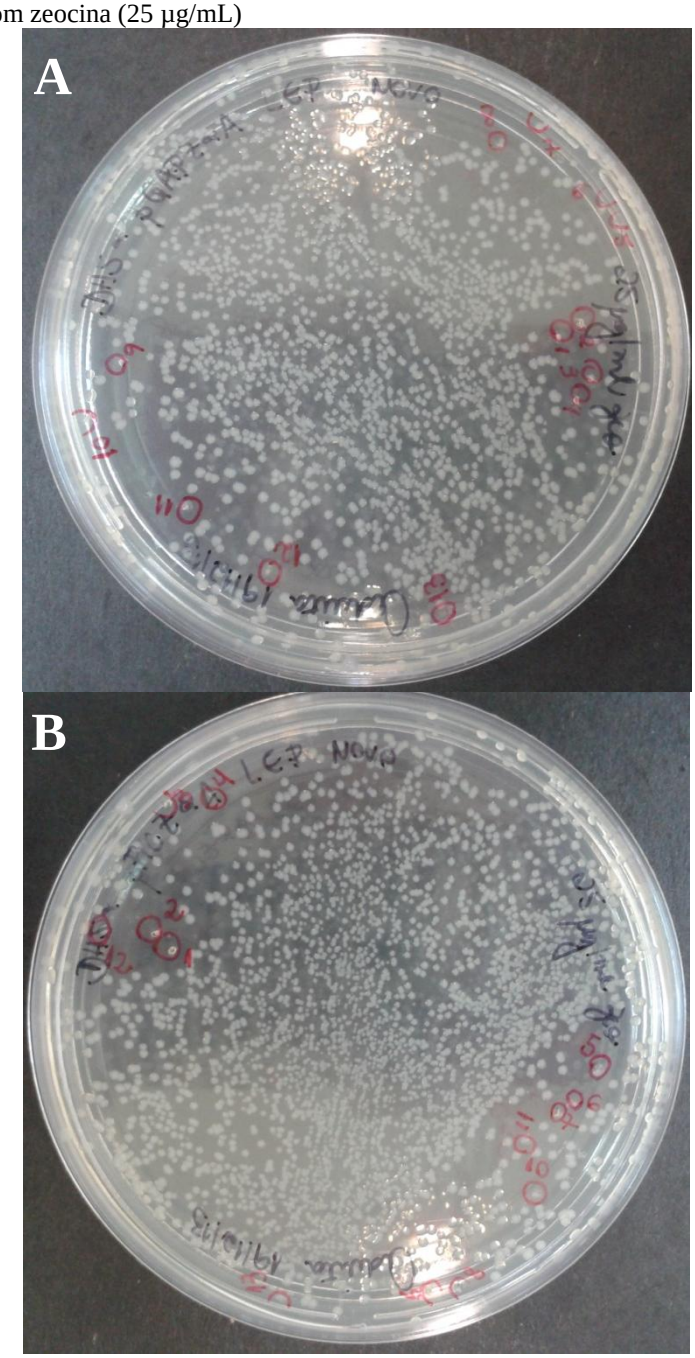
Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 1% corada com brometo de etídeo, mostrando a clivagem do plasmídeo pTZlep com as enzimas *Eco*RI e *Sal*I




M) Marcador molecular (100 pb); 1 a 3) Plasmídeo pTZlep

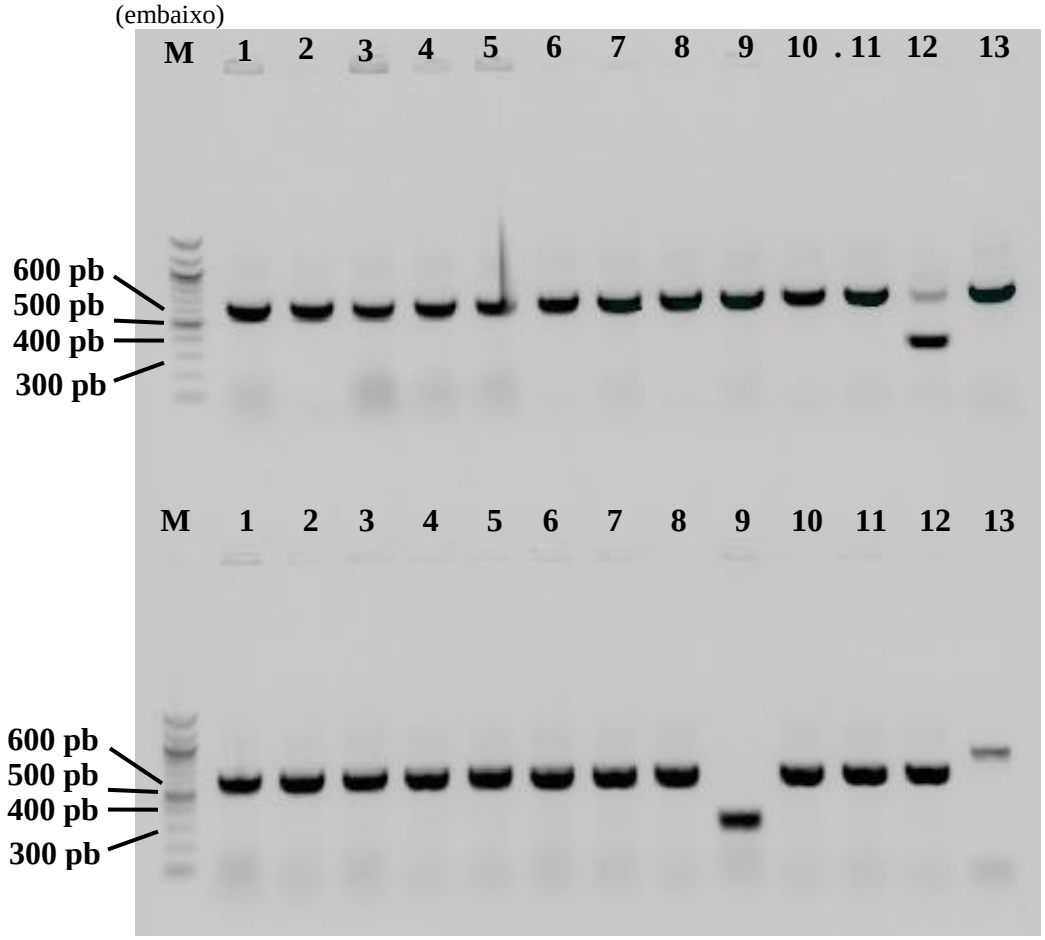
Após clivagem do plasmídeo pTZlep e da linearização dos vetores de expressão pGAPZαA e pPICZαA com as enzimas *Eco*RI e *Sal*I, fragmentos de 456 pb (inserto), de aproximadamente 3,6 kb (pPICZαA) e de aproximadamente 3,1 kb (pGAPZαA) foram purificados do gel de agarose. O inserto foi clonado nos vetores de expressão (gerando os plasmídeos pPICbLep e pGAPbLep) e transformado novamente em bactérias *E. coli* DH5α. Os clones recombinantes foram selecionados utilizando o antibiótico zeocina e as placas apresentaram grande número de colônias, indicando uma boa eficiência de transformação (Figura 14).

Figura 14 - Bactérias *E.coli* DH5α transformadas com os plasmídeos pGAPbLep (A) e pPICbLep (B) em meio LB agar com zeocina (25 µg/mL)




Escolheu-se aleatoriamente 13 colônias de cada placa (pPICbLep e pGAPbLep) para confirmar se eram mesmo recombinantes, por PCR de colônia utilizando o par de *primers* dos vetores (fator α e AOX 3'), sendo que 12 colônias de cada placa foram positivas, apresentando fragmento de cerca de 650 pb no gel de agarose. Apenas as colônias 12 e 9, respectivamente das transformações com os plasmídeos pPICbLep e pGAPbLep foram negativas, apresentando bandas de 300 pb, referentes apenas ao fragmento amplificado dos vetores (Figura 15).

Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 1% corada com brometo de etídeo, mostrando a PCR de colônia de bactérias *E. coli* DH5α transformadas com os plasmídeos pPICbLep (em cima) e pGAPbLep (embaixo)




As bandas de ~ 640 pb indicam colônias recombinantes. As bandas de ~ 300 pb indicam as colônias sem presença do inserto

A análise do sequenciamento do fragmento amplificado em reação de PCR utilizando os *primers* dos vetores (fator α e AOX 3') mostrou 99% de identidade com a sequência do mRNA da leptina bovina (NCBI Reference Sequence NM 173928.2), mostrou também a correta orientação do gene de interesse nos vetores de expressão, entre a sequência do peptídeo sinal de secreção (fator α) e a sequência codificadora da cauda de polihistidina (Figura 16). Clare et al. (1991b) expressaram o fator de crescimento epidermal de camundongo em leveduras *P. pastoris* e *S. cerevisiae*, sob controle do promotor do gene *AOX1*, ambos utilizando o peptídeo sinal do *S. cerevisiae* (fator α), e observaram uma correta clivagem do peptídeo sinal, indicando que o fator α é corretamente reconhecido e processado pela *P. pastoris.* Já Wang et al. (2002) expressaram lactoferrina porcina em *P. pastoris* utilizando o promotor do gene *GAP* e a sequência sinal de secreção própria da *P. pastoris* ou o fator α do *S. cerevisiae.* Os autores observaram uma expressão maior quando o fator α foi

utilizado, sendo que a produção da lactoferrina em *P. pastoris* (12 mg/L) foi maior que a produção em *S. cerevisiae* (1 a 2 mg/L).

Figura 16 - Sequenciamento do inserto contendo o gene da leptina bovina, utilizando os *primers* fator α (F) e AOX 3' (R)

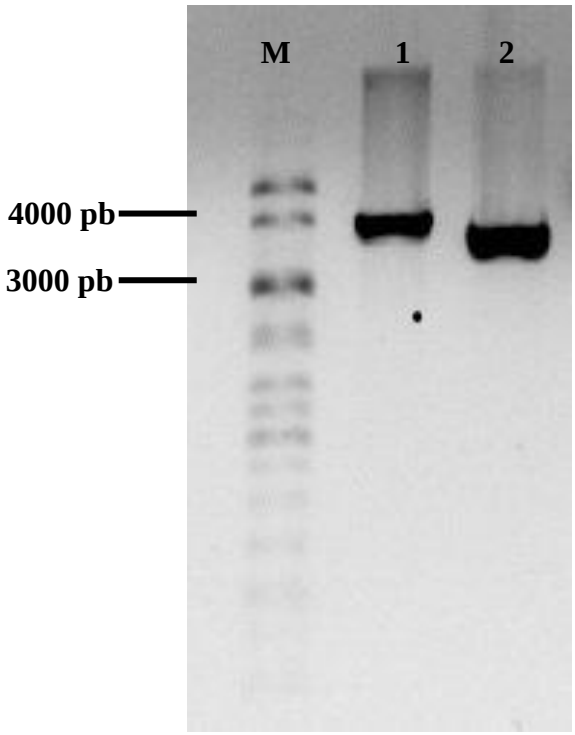
```
Query  41   GTGCCCATCTGCAAGGTCCAGTGATGACACCAAAACCCTCATCAAGACAATTGTCA-CAG  99
            |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||| |||
Sbjct  111  GTGCCCATCTGCAAGGTCCAG-GATGACACCAAAACCCTCATCAAGACAATTGTCACCAG  169

Query  100  GATCAATGACATCTCACACACGCAGTCCGTCTCCTCCAAACAGAGGGTCACTGGTTTGGA  159
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  170  GATCAATGACATCTCACACACGCAGTCCGTCTCCTCCAAACAGAGGGTCACTGGTTTGGA  229

Query  160  CTTCATCCCTGGGCTCCACCCTCTCCTGAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACATTGGCGAT  219
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  230  CTTCATCCCTGGGCTCCACCCTCTCCTGAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACATTGGCGAT  289

Query  220  CTACCAACAGATCCTCACCAGTCTGCCTTCCAGAAATGTGGTCCAAATATCCAATGACCT  279
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  290  CTACCAACAGATCCTCACCAGTCTGCCTTCCAGAAATGTGGTCCAAATATCCAATGACCT  349

Query  280  -GAGAACCTCCGGGACCTTCTCCACCTGCTGGCCGCCTCCAAGAGCTGCCCCTTGCCGCA  338
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  350  GGAGAACCTCCGGGACCTTCTCCACCTGCTGGCCGCCTCCAAGAGCTGCCCCTTGCCGCA  409

Query  339  GGTCAGNGGCCCT-GAGAGCTTGGAGAGCTTGGGCGTTGTCCTGGAAGCTTCCCTCTACT  397
            |||||| |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  410  GGTCAG-GGCCCTGGAGAGCTTGGAGAGCTTGGGCGTTGTCCTGGAAGCTTCCCTCTACT  468

Query  398  CCACCGAGGTGGTGGCCCTGAGCCGGCTGCAGGGGTCTACTACAGGACATGTTGCGGCAG  457
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct  469  CCACCGAGGTGGTGGCCCTGAGCCGGCTGCAGGGGTC-ACTACAGGACATGTTGCGGCAG  527

Query  458  CTGGACCTCAGTCCCGGGTGC  478
            ||||||||||||||||||||
Sbjct  528  CTGGACCTCAGTCCCGGGTGC  548
```

Quatro colônias recombinantes pPICbLep e quatro pGAPbLep foram selecionadas para a análise de restrição com as enzimas *Eco*RI e *Sal*I e todas apresentaram duas bandas bem definidas, uma de cerca de 456 pb (inserto) e uma de aproximadamente 3,0 kb (pGAPZαA) ou 3,5 kb (pPICZαA). Desta forma, escolheu-se os plasmídeos pPICbLep1 e pGAPbLep1 para linearização com as enzimas de restrição *Pme*I e *Xma*JI, respectivamente, e transformação da *Pichia*. Após a linearização, o plasmídeo pPICbLep apresentou banda de aproximadamente 4 kb e o pGAPbLep de aproximadamente 3,5 kb, no gel de agarose(Figura 17).

A cepa de *Pichia* utilizada (KM71H) apresenta fenótipo $Mut^S$, ou seja, apresenta crescimento lento em meio com metanol, uma vez que é *knockout* para o gene *AOX1*, e que possui apenas o gene *AOX2* ativo, expresso em menores níveis (LOMBARDI et al., 2010). Desta forma, com a integração do plasmídeo pPICbLep no *locus AOX1* do genoma da *Pichia*,

ela passa a crescer mais rapidamente em meio contendo metanol como única fonte de carbono.

Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 1% corada com brometo de etídeo, mostrando os plasmídeos pPICbLep e pGAPbLep linearizados com as enzimas *Pme*I e *Xma*JI, respectivamente




M) Marcador molecular Gene Ruler 1 kb (Fermentas); 1) pPICbLep; 2) pGAPbLep

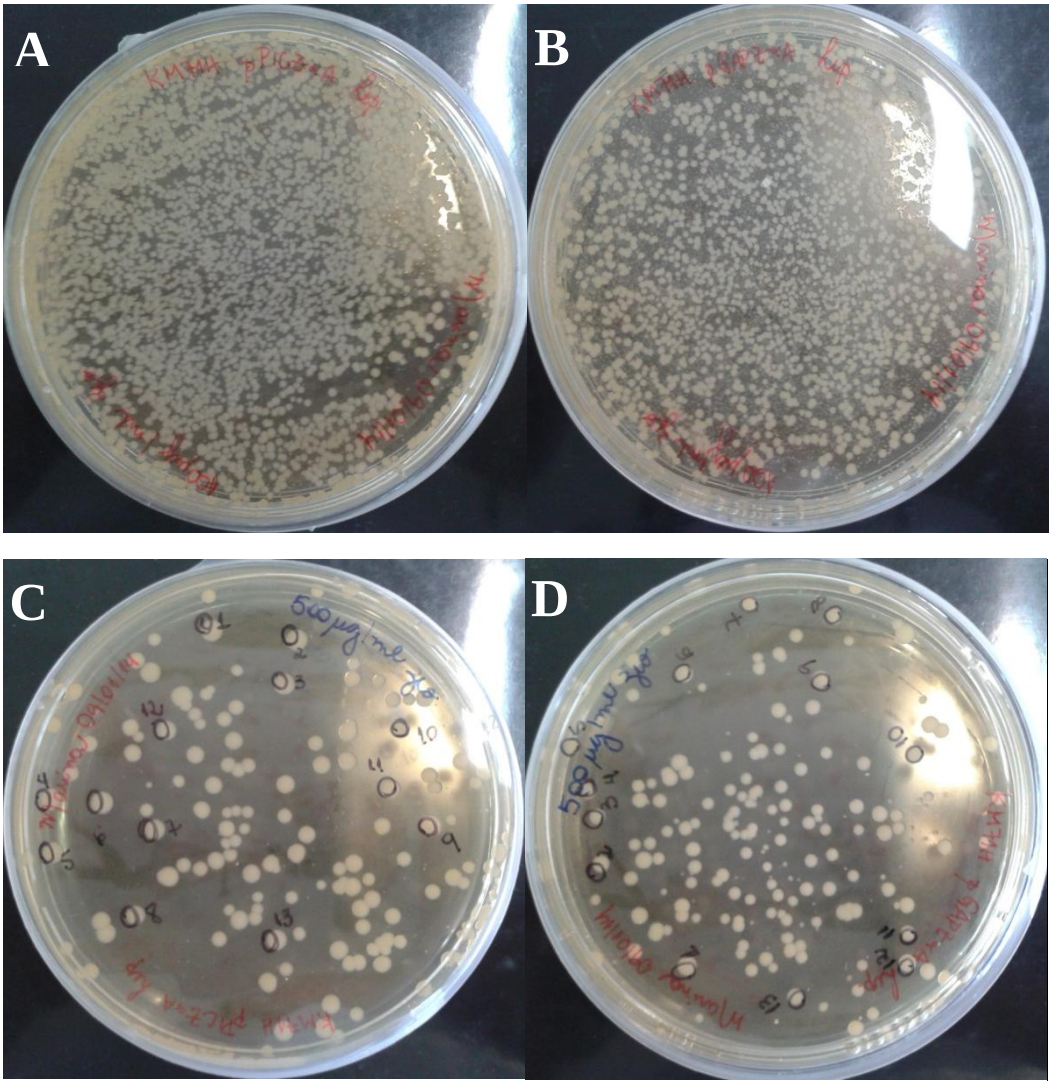
A *Pichia* eletrocompetente foi eletroporada e cada transformação foi plaqueada em duas placas de Petri contendo meio YEPD com concentrações diferentes de zeocina, sendo uma com 100 µg/mL e outra com 500 µg/mL. Todas as placas apresentaram crescimento de várias colônias (Figura 17). O uso de alta concentração de zeocina no meio de cultura permitiu selecionar clones com integração de múltiplas cópias do gene de interesse.

Vários resultados demonstraram que a produção da proteína heteróloga pode estar relacionada com o número de cópias do gene de interesse, sendo que em muitos casos, insertos integrados em múltiplas cópias apresentam maior nível de expressão (CLARE et al., 1991a; 1991b; WERTEN et al., 1999). Entretanto, Thill et al. (1990) demonstraram que um maior número de cópias pode ter efeito negativo sobre a produção da proteína. Na verdade, o efeito do número de cópias na expressão é imprevisível e Henry et al. (1997) demonstraram que não há correlação entre essa variável e a expressão de proteína precursora de amiloide

humana. Outros fatores, como o sítio de integração genômica, a estabilidade e características da proteína podem ser fatores de grande importância.

Laborde et al. (2004) expressaram leptina recombinante ovina em leveduras *P. pastoris* e observaram que cepas de fenótipo $Mut^{+}$, com gene *AOX1* ativo e, portanto, com rápido crescimento em meio contendo metanol como única fonte de carbono, apresentaram maior expressão da proteína quando apenas uma cópia do cassete de expressão, contendo o gene de interesse, se integrou ao genoma da levedura. Por outro lado, quando várias cópias se integraram, como no caso dos clones selecionados neste trabalho, o fenótipo $Mut^{S}$ apresentou maior expressão. Esses dados são idênticos aos obtidos por Clare et al. (1991a) para a expressão do fragmento C da toxina tetânica. Estes autores também observaram produção levemente maior para os clones $Mut^{+}$ com integração de uma cópia do cassete de expressão, e para clones $Mut^{S}$ com integração de múltiplas cópias.

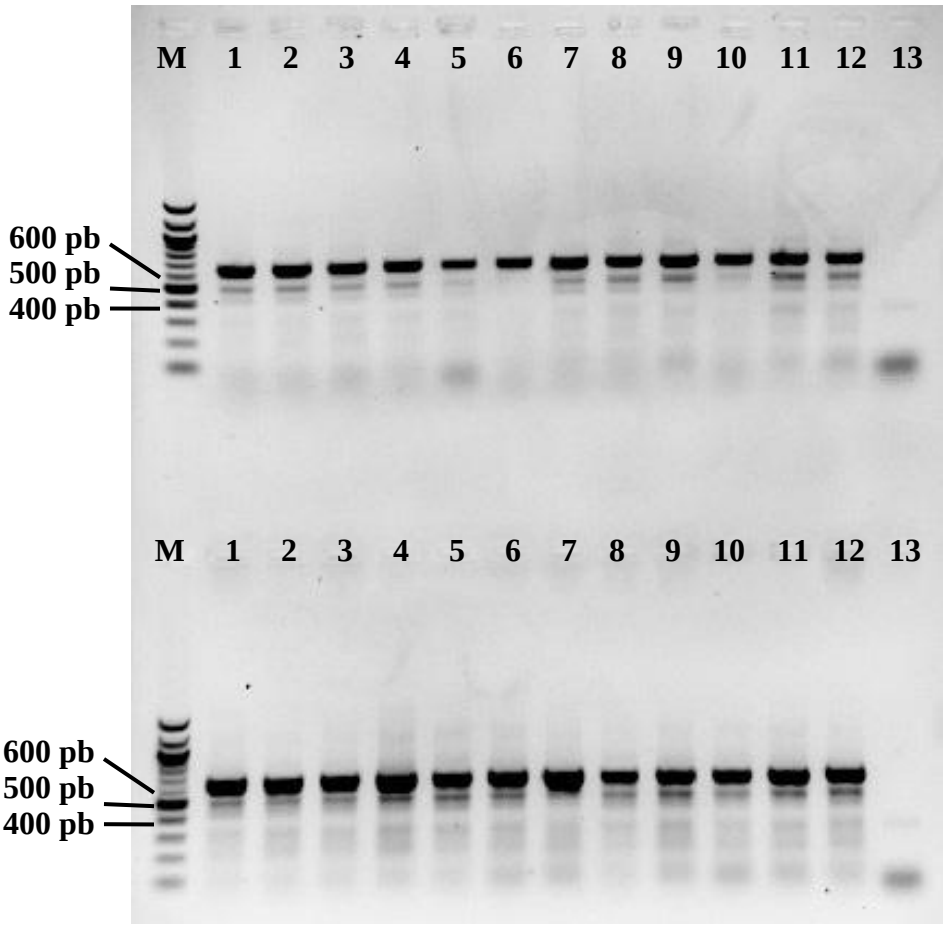
Figura 18 - Leveduras *Pichia pastoris* KM71H transformadas com os plasmídeos pPICbLep (A e C) e pGAPbLep (B e D)




Placas A e B apresentam 100 µg/mL de zeocina. Placas C e D apresentam 500 µg/mL de zeocina

Doze colônias de cada placa de 500 µg/mL de zeocina foram selecionadas para a análise da presença do inserto por PCR de colônia, utilizando o par de *primers* dos vetores (fator α e AOX 3'), e todas as colônias foram consideradas recombinantes, apresentando bandas de aproximadamente 640 pb no gel de agarose (Figura 19).

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, mostrando a PCR de colônia de leveduras *Pichia pastoris* cepa KM71H transformadas com os plasmídeos pPICbLep (em cima) e pGAPbLep (embaixo)




### 5.2.2 Expressão de leptina recombinante bovina em pequena escala

A secreção das proteínas recombinantes no meio de cultura apresenta inúmeras vantagens sobre a produção citossólica. Por exemplo, o aminoácido N-terminal do produto secretado pode ser idêntico ao da proteína nativa, após a clivagem da sequência sinal por uma peptidase específica (WHITE et al., 1994; SBERNA et al., 1996).

A otimização da produção de proteínas heterólogas em *P. pastoris* normalmente envolve o isolamento de um clone com integração de várias cópias do gene de interesse, após a transformação, o que normalmente leva a um maior nível de expressão (CLARE et al., 1991a,b; WERTEN et al., 1999; VASSILEVA et al., 2001). Tendo isso em vista, selecionamos os clones que cresceram nas placas YEPD contendo a maior concentração de zeocina (500 µg/mL), para a análise de expressão em pequena-escala.

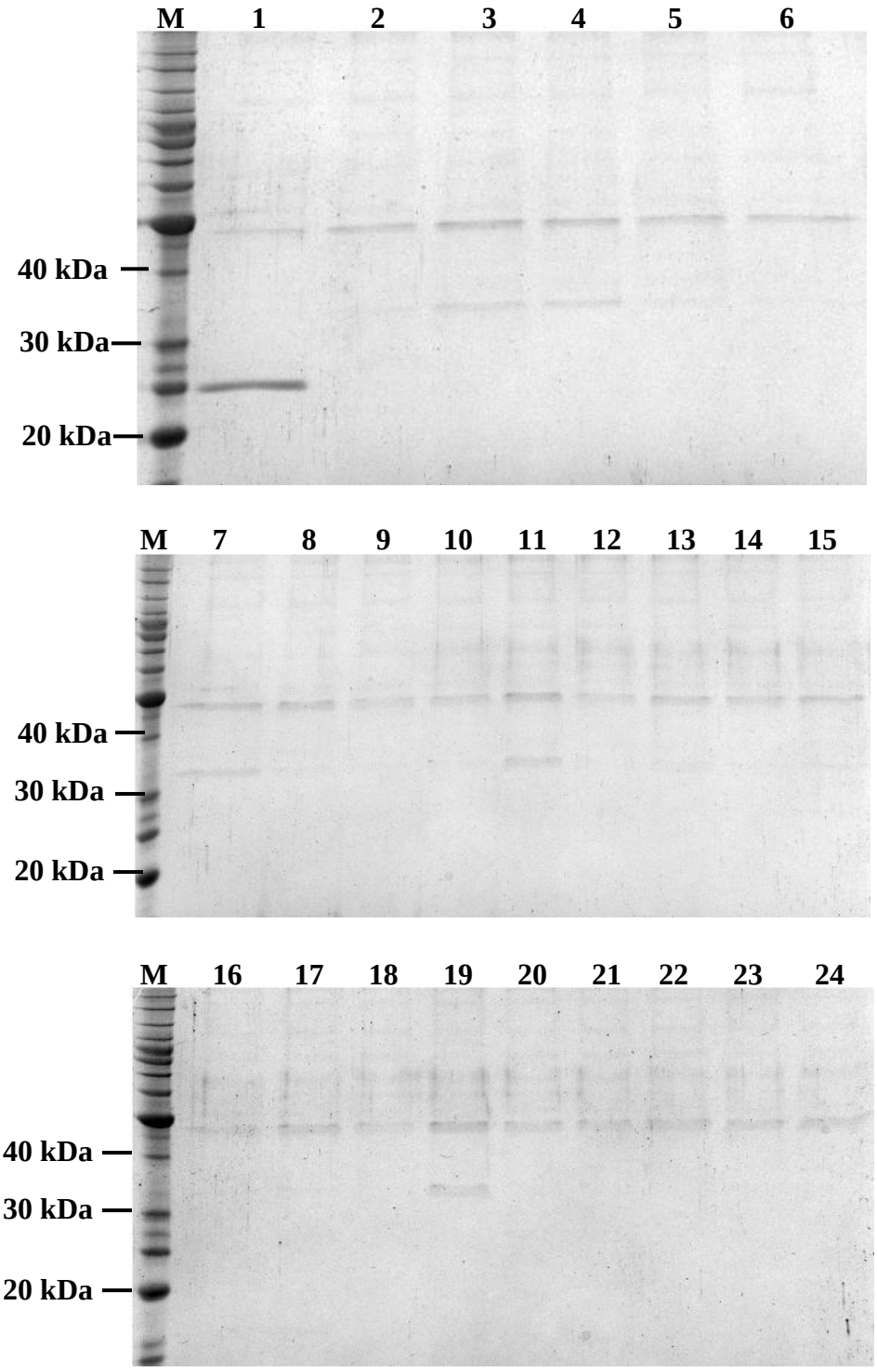
Nos clones KM71H-pPICbLep, a leptina recombinante foi produzida durante a fase de indução com metanol, enquanto nos clones KM71H-pGAPbLep a leptina foi produzida de forma constitutiva.

Os clones transformados com o plasmídeo pPICbLep não expressaram a leptina recombinante bovina no meio de cultura, evidenciado pela ausência de banda no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

A análise em SDS-PAGE dos clones transformados com o plasmídeo pGAPbLep, mostrou presença de proteína de aproximadamente 35 kDa (Figura 20), para os clones 2, 3, 4, 5, 7, 11 e 19. Esta proteína não estava presente nos controles positivo e negativo. O controle positivo apresentou uma banda forte entre 20 e 30 kDa, referente à endoglucanase 3.

A molécula da leptina apresenta cerca de 16 kDa (ZHANG et al., 1994) e, como a adição da cauda de poli-histidina adiciona cerca de 1 kDa, o tamanho esperado da bLeptina era de cerca de 17 kDa. Porém o gel mostrou expressão de uma molécula com praticamente o dobro desse tamanho (~ 35 kDa). Possivelmente esse fato ocorreu devido à dimerização da bLeptina.

Figura 20 - Análise em SDS-PAGE 15% da expressão em pequena escala de bLeptina em transformantes de *Pichia pastoris* (pGAPbLep)




M) Marcador de massa molecular Bench Mark (Invitrogen); 1) Controle positivo (Endonuclease 3); 1-23) Colônias recombinantes; 24) Controle negativo

A dimerização da leptina recombinante, produzida em *E. coli*, já foi relatada em diversos trabalhos, durante o redobramento *in vitro* da molécula, na purificação a partir dos

corpos de inclusão. Por exemplo, Gertler et al. (1998) relataram 10% de formação de dímeros de leptina recombinante ovina. Jeong e Lee (1999) obtiveram pequena quantidade de dímeros de leptina recombinante humana, evidenciados por uma banda de aproximadamente 32 kDa no SDS-PAGE. Raver et al. (2000), preparando leptina recombinante bovina e porcina, obervaram a presença apenas de monômeros na leptina porcina, enquanto que na bovina, houve 5% de dímeros. Os dímeros apresentavam bandas de cerca de 32 kDa no SDS-PAGE, que caíam para 15 a 16 kDa quando a análise era feita em condições redutoras, compatível com a leptina monomérica. O mesmo foi relatado por Yacobovitz et al. (2008), que observaram bandas de aproximadamente 30 kDa no SDS-PAGE de dímeros de leptina de baiacu, as quais passavam para cerca de 15 kDa, em condições redutoras.

O exato mecanismo de dimerização da leptina ainda não é conhecido, mas Li et al. (2009), analisando dímeros de leptina humana com aproximadamente 35 kDa, concluíram que as moléculas eram unidas por uma ponte dissulfeto intermolecular, principalmente entre os resíduos de cisteína Cys146 de cada molécula. Essa ponte intermolecular provavelmente alterou a conformação da alça CD da molécula de leptina (Figura 2), determinando a baixa capacidade de ligação relatada entre o dímero e o receptor de leptina (15%, comparando com a molécula monomérica). Não há relatos da ocorrência de dímeros de leptina na circulação ou no tecido adiposo, uma vez que possíveis problemas de dobramento, com alteração estrutural das proteínas, podem ser corrigidos por chaperonas (LIBEREK et al., 2008) ou dissulfeto isomerases (TANG et al., 1990), ou ainda, essas moléculas alteradas podem ser degradadas rapidamente nas células (TAI et al., 2008).

Apesar de não haver estudos sobre a dimerização da leptina recombinante produzida em *Pichia*, o padrão de migração no SDS-PAGE da molécula dimerizada produzida em *E. coli*, relatado na literatura, é condizente com o observado nesse trabalho, apresentando bandas com aproximadamente o dobro do tamanho da molécula monomérica. Laborde et al. (2004), que expressaram leptina recombinante ovina em *P. pastoris*, não citam a presença de dímeros, entretanto, desde o início, a análise em SDS-PAGE foi realizada sob condições redutoras.

Ao contrário desse trabalho, Laborde et al. (2004) obtiveram sucesso em expressar leptina recombinante ovina em leveduras *Pichia pastoris*, sob controle do promotor do gene *AOX1* e, portanto, utilizando metanol como indutor. Entretanto, os autores observaram degradação da oLeptina produzida, evidenciada no gel SDS-PAGE pela presença de duas bandas: uma de 16 kDa, referente à leptina íntegra, e uma de 13 kDa, referente à leptina degradada. Os autores observaram ainda que a proteólise começou no início da fase de *"fed-batch"* da indução, alcançando cerca de 37 a 45% de degradação ao final.

A proteólise pode ocorrer pela liberação de proteases endocelulares no meio de cultura, após a lise das células. Várias proteases já foram identificadas em *P. pastoris*, como KEX1, KEX2, proteinase A, proteinase B e carboxipeptidase Y, por exemplo (LABORDE et al., 2004). Existem várias estratégias para tentar reduzir a ocorrência de proteólise durante a produção de proteínas recombinantes, como modificação no pH do meio de cultura (SCORER et al., 1993; WERTEN et al., 1999), suplementação do meio com elementos ricos em aminoácidos (casaminoácidos ou peptonas) (CLARE et al., 1991b) ou uso de cepas deficientes em proteases (CREGG et al., 1993).

No trabalho citado acima, de Laborde et al. (2004), a proteólise da oLeptina foi reduzida para 5% quando o pH do meio foi reduzido de 4,9 para 3,2. Por outro lado, Clare et al. (1991b) observaram que a proteólise do fator de crescimento epidermal de camundongos produzida em *P. pastoris* foi inibida com o tamponamento do meio em pH 6,0 e adição de 1% de casaminoácidos. De acordo com Kobayashi et al. (2000), houve rápida degradação da soroalbumina humana produzida em *P. pastoris* sob controle do promotor do gene *AOX1*, sendo que a adição de amônia e ácido fosfórico no meio preveniu a ocorrência de proteólise, enquanto a redução do pH do meio de 5,9 para 4,3 aumentou a atividade das proteases e a taxa de degradação da proteína de interesse. Assim, percebe-se que as condições de cultura durante a indução da expressão devem ser otimizadas de acordo com a proteína que se deseja produzir.

Já em outro estudo, realizado por Henry et al. (1997), duas cepas de *P. pastoris* foram utilizadas, sendo uma produtora de proteases (GS115) e a outra deficiente em proteases (SMD 1163), para a expressão de proteína precursora de amiloide humana. Os autores não observaram diferença no nível de degradação das proteínas produzidas de acordo com a cepa utilizada.

A produção de leptina recombinante em sistemas heterólogos envolve um importante estresse celular, com distúrbios de metabolismo levando a uma queda drástica na taxa de crescimento celular e na geração de biomassa (LABORDE et al., 2004). Sabe-se que a superexpressão de proteínas heterólogas desvia uma parte substancial do metabolismo celular (sobrecarga metabólica), o que resulta em desaceleração do crescimento celular (BENTLEY et al., 1990). Laborde et al. (2004) observaram que apenas 70% da população celular foi capaz de crescer durante a indução, sendo que os outros 30% representaram células incapazes de crescer ou mortas. A morte celular ocorreu principalmente durante as últimas 20 horas de indução, passando rapidamente de 8% para cerca de 17%. Esse resultado é semelhante ao

observado por Hohenblum et al. (2002) para a expressão de tripsinogênio humano em *P. pastoris* e por Lin et al. (2001) para a produção de α-glicosidase humana em bactérias *E. coli*.

O efeito da expressão de proteínas heterólogas em perturbar o metabolismo celular ocorre em vários níveis, como replicação cromossômica, transcrição, tradução, metabolismo do carbono e respiração (NEUBAUER; WINTER, 2001). A tradução é afetada não somente em seu início, mas também na velocidade da elongação, que é muito influenciada pelo *codon usage* (SORENSEN; PEDERSEN, 1991). Vírus, células procarióticas e células eucarióticas usam os diferentes códons em frequências diferentes. A expressão de uma proteína heteróloga por um organismo diferente do natural pode envolver uma alta utilização de códons raramente utilizados por tal organismo. A presença desses códons raros no mRNA leva à inibição do crescimento celular e à morte celular, uma vez que outros mRNAs da célula competem pelo mesmo tRNA. Assim, a síntese dessas proteínas é bloqueada pelo alto número de códons raros no mRNA (ZAHN et al., 1996).

O fato de cepa utilizada nesse trabalho, KM71H, ser produtora de protease, aliado à toxicidade do metanol às leveduras (BAWA; DARBY, 2012; SANTOSO et al., 2012), podem ter contribuído para a não expressão da bLeptina pelos clones contendo o plasmídeo pPICbLep. A concentração da proteína heteróloga no meio de cultura depende da biomassa de células, sendo que dificuldades em aumentar a produção de biomassa durante a fase de indução, pode prejudicar a expressão da proteína de interesse (LABORDE et al., 2004).

Com relação ao número de cópias do gene de interesse integradas ao genoma da levedura, Vassileva et al. (2001) expressaram o antígeno de superfície da hepatite B em *P. pastoris*, utilizando o promotor do gene *GAP*, e observaram que o nível de expressão máxima em construções contendo apenas uma cópia integrada do gene de interesse ocorreu após 6 dias de cultura. Os autores observaram também que a integração de cópias múltiplas do gene de interesse, aumentou a produção da proteína através de uma correlação direta entre número de cópias integradas e nível de produção. O mesmo foi obervado por Mansur et al. (2005), com a expressão de precursor de insulina sob controle do promotor do gene *AOX1* e utilizando a sequência sinal de secreção do fator α.

Um outro fator que pode ter contribuído para o aumento na banda observada no SDS-PAGE (Figura 20), pode ter sido a superglicosilação da proteína recombinante, alterando a massa total da proteína e seu padrão de migração no SDS-PAGE. Entretanto, alguns fatos falam contra essa suposição. Apesar de a *Pichia* normalmente glicosilar as proteínas recombinantes, principalmente através de N-glicosilação, o padrão de glicosilação observado em *P. pastoris* é mais próximo do padrão normalmente encontrado em mamíferos,

comparando com o observado em *S. cerevisiae* (LI et al,. 2007). Da mesma forma, a *Pichia* não apresenta tendência de superglicosilar as proteínas, adicionando cadeias de oligossacarídeos com cerca de 8 a 14 resíduos de manose, enquanto o *Saccharomyces* pode adicionar de 40 a 150 manoses (TRIMBLE et al., 1991). Entretanto, a tendência da *Pichia* de superglicosilar ou não uma determinada proteína, depende da proteína em questão (LI et al., 2007). Nesse trabalho, a sequência de aminoácidos da leptina bovina foi analisada quanto à sua tendência à glicosilação pelos programas NetNGlyc 1.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc) e NetOGlyc 4.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc), não sendo observado potencial para a ocorrência de N-glicosilação e apresentando um poetencial muito baixo para O-glicosilação.

Em resumo, as leveduras transformadas com o plasmídeo pPICbLep não expressaram a bLeptina após 144 horas de indução na presença de metanol. Já as leveduras transformadas com o plasmídeo pGAPbLep expressaram, de forma constitutiva, uma proteína com o dobro do tamanho esperado para a bLeptina, o que provavelmente indica a ocorrência de dimerização da molécula da bLeptina.

# 6 CONCLUSÕES

A administração de leptina recombinante ovina, na dose de 4,8 µg/kg PV duas vezes ao dia aumentou, de forma transitória, a concentração sérica de leptina de novilhas zebuínas recebendo dieta de baixa energia, o que provavelmente deveu-se ao fato de o tratamento com leptina ter reduzido a expressão do gene da leptina no tecido adiposo, o que sugere a existência de um mecanismo de *feedback* em bovinos.

A região codificadora da leptina bovina foi clonada nos vetores pPICZαA e pGAPZαA, e leveduras *Pichia pastoris* KM71H foram transformadas com sucesso, gerando grande número de colônias recombinantes, o que foi confirmado pelo sequenciamento.

As colônias pPICbLep, cuja expressão da bLeptina necessita da presença do indutor metanol, não expressaram a proteína recombinante no meio de cultura, provavelmente devido à ocorrência de proteólise, em decorrência da liberação de proteases vacuolares no meio, após a lise celular, uma vez que o processo de expressão heteróloga causa grande estresse celular e que o metanol apresenta toxicidade às leveduras.

As colônias pGAPbLep expressaram uma proteína de cerca de 35 kDa, praticamente o dobro do tamanho esperado para a leptina bovina (cerca de 17 kDa), o que provavelmente indica a ocorrência de dimerização dessas moléculas. Uma suposição menos provável seria a ocorrência de superglicosilação.

## 6.1 IMPLICAÇÕES

O desenvolvimento de um sistema de expressão de leptina recombinante bovina em larga escala, baseado em leveduras *Pichia pastoris*, permitindo sua utilização para pesquisas sobre o papel da leptina na reprodução de animais de grande porte, como os bovinos, ainda está engatinhando, visto o número ínfimo de artigos publicados. A partir desse trabalho, sugere-se que um ponto importante para pesquisas futuras seria o estudo da ocorrência e do mecanismo da dimerização da leptina recombinante em *P. pastoris*, e seu possível impacto na atividade biológica da molécula.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, S. K.; VOGEL, K.; WEITSMAN, S. R.; MAGOFFIN D. A. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary**. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, n. 3, p. 1072-1076, 1999.

AHIMA, R. S.; DUSHAY, J.; FLIER, S. N.; PRABAKARAN, D.; FLIER, J. S. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. **Journal of Clinical Investigation,** v. 99, n. 3, p. 391–395, 1997.

AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as na endocrine organ. **Trends in Endocrinology and Metabolism,** v. 11, p. 327-332, 2000.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell.** 2. ed. New York: Garland Press, 1989. 1219 p.

AMSTALDEN, M.; GARCIA, M. R.; STANKO, R. L.; NIZIELSKI, S. E.; MORRISON, C. D.; KEISLER, D. H.; WILLIAMS, G. L. Central infusion of recombinant ovine leptin normalizes plasma insulin and stimulates a novel hypersecretion of luteinizing hormone after short-term fasting in mature beef cows. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1555-1561, 2002.

AMSTALDEN, M.; ZIEBA, D. A.; EDWARDS, J. F.; HARMS, P.G.; WELSH, T. H.; STANKO, R. L.; WILLIAMS, G. L. Leptin acts at the bovine adenohypophysis to enhance basal and gonadotropin-releasing hormone-mediated release of luteinizing hormone: Differential effects are dependent upon nutritional history. Biology of Reproduction, v. 69, n. 5, p. 1539-1544, 2003.

BANKS, W.; COON, A. B.; ROBINSON, S. M.; MOINUDDIN, A.; SCHULTZ, J. M.; NAKAOKE, R.; MORLEY, J. E. Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. **Diabetes,** v. 53, p.1253-1260, 2004.

BANKS, W. A. The many lives of leptin. **Peptides,** v. 25, p. 331-338, 2004.

BANKS A. S. ; DAVIS S. M.; BATES S. H. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor**. Journal Biology Chemical,** v. 12, n. 19, p. 14563-72, 2000.

BARASH, I. A.; CHEUNG, C. C.; WEIGLE, D. S.; REN, H.; KABIGTING, E. B.; KUIJPER, J. L.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology,** v. 137, n. 7, p. 3144–3147, 1996.

BARB, C. R . The brain-pituitary-adipocyte axis: role of leptin in modulating neuroendocrine function. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 5, p. 1249-1257, 1999.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts:** characteristics and identification. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 1012 p.

BAWA, Z.; DARBY, R. A. Optimizing *Pichia pastoris* induction. **Methods in Molecular Biology,** v. 866, p. 181-190, 2012.

BELTRAN, M. P. **Possíveis efeitos da leptina e IGF-I plasmáticos sobre a puberdade e a precocidade sexual de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2007. 106 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

BENTLEY, W. E.; MIRJALILI, N.; ANDERSEN, D. C.; DAVIS, R. H.; KOMPALA, D. S. The principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. **Biotechnology and Bioengineering,** v. 35, p. 668-681, 1990.

BJØRBAEK, C.; ELMQUIST, J. K.; FRANTZ, J. D.; SHOELSON, S. E.; FLIER, J. S. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. **Molecular Cell**, v. 1, n. 4, p. 619-625, 1998.

BJØRBAEK, C.; EL-HASCHIMI, K.; FRANTZ, J. D.; FLIER, J. S. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. **Journal Biology Chemical,** v. 15, n. 42, p. 30059-65, 1999.

BJØRBÆK, C.; KAHN, B. B. Leptin Signaling in the Central Nervous System and the Periphery **Recent Progress in Hormone Research,** v. 59,p. 305-331, 2004.

BLACHE, D.; TELLAM, R. L.; CHAGAS, L. M.; BLACKBERRY, M. A.; VERCOE, P. E.; MARTIN, G. B. Level of nutrition affects leptin concentration in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. **Journal of Endocrinology,** v. 165, p. 625-637, 2000.

BOER, H.; TEERI, T. T.; KOIVULA, A. Characterization of *Trichoderma reesi* cellobiohydrolase Cel7A secreted from *Pichia pastoris* using two different promoters. **Biotechnology and Bioengineering,** v. 69, p. 486-494, 2000.

BOLAND, M. P.; LONERGAN, P.; O'CALLAGHAN, D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development , **Theriogenology**, v.55, n. 6, p. 1323-1340.2001.

BRETTHAUER, R. K.; CASTELLANO, F. J. Glycosilation of *Pichia pastoris*-derived proteins. **Biotechnology and Applied Biochemistry,** v. 30, p. 193-200, 1999.

BRONSON, F. H. Puberty in female rats: relative effect of exercise and food restriction. **American Journal of Physiology**, v. 252, p. 140-144, 1987.

CAMPFIELD, L. A.; SMITH, F. J.; BURN, P. OB protein: a hormonal controller of central neural networks mediating behavioural, metabolic and neuroendocrine responses. **Endocrinology and Metabolism,** v. 4, p. 81-102, 1997.

CARVALHO, M. V. **Efeito do fornecimento crônico de leptina e da nutrição na maturação sexual de novilhas zebuínas (*Bos taurus indicus*).** 2009. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

CARVALHO, M. V.; DINIZ-MAGALHÃES, J.; PEREIRA, A. S. C.; SANTOS, M. V.; SILVA, L. F. P. Effect of chronic infusion of leptin and nutrition on sexual maturation of zebu heifers. **Journal of Animal Science,** v. 91, p. 1207-1215, 2013.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.

CHEHAB, F. F.; MOUNZIH, K.; LU, R.; LIM, M. E. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. **Science,** v. 275, n. 5296, p. 88–90, 1997.

CHEUNG, C. C.; THORNTON, J. E.; KUIJPER, J. L.; WEIGLE, D. S.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. **Endocrinology,** v. 138, n. 2, p. 855–858, 1997.

CHILLIARD, Y.; BOCQUIER, F.; DELAVAUD, C.; GUERRE-MILLO, M.; BONNET, M.; MARTIN, P.; FAULCONNIER, Y.; FERLAY, A. Leptin in ruminants: effects of species, breed, adiposity, photoperiod, β-agonists and nutritional status. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 1998, New York. **Proceedings…** 1998. p.65-74.

CHILLIARD, Y.; BONNET, M.; DELAVAUD, C.; FAULCONNIER, Y.; LEROUX, C.; DJIANE, J.; BOCQUIER, F. Leptin in ruminants: Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. **Domestic Animal Endocrinology,** v. 21, p. 271-295, 2001.

CHILLIARD, Y.; DELAVAUD, C.; BONNET, M. Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. **Domestic Animal Endocrinology,** v.2 9, p. 3-22, 2005.

CHOI, J. H.; LEE, S. Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 64, p. 625-635, 2004.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anals of Biochemistry**, v. 162, p. 156-159, 1987.

CLARE, J. J.; RAYMENT, F. B.; BALLANTINE, S. P.; SREEKRISHNA, K.; ROMANO, M.A. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. **Biotechnology,** v. 9, p. 455-460, 1991a.

CLARE, J. J.; ROMANES, M. A.; RAYMENT, F. B.; ROWEDDER, J. E.; SMITH, M. A.; PAYNE, M. M.; SREEKRISHNA, K.; HENWOOD, C. A. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. **Gene,** v. 105, p. 205-212, 1991b.

CONSIDINE, R. V.; CARO, J. F. Leptin in humans: current progress and future directions. **Clinical Chemistry,** v. 42, p. 843-844, 1996.

CREGG, J. M. Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In: JOSEPH, M. F.; HOEFFLER, P. (Ed.). **Gene expression systems**. [S.l.]: Academic Press, 1999.

CREGG, J. M.; MADDEN, K. R.; BARRINGER, K. J.; THILL, G. P.; STILLMAN, C. A. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 1316-1323, 1989.

CREGG, J. M.; BARRINGER, K. J.; HESSLER, A. Y.; MADDEN, K. R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Mollecular Cell Biology,** v. 5, p. 3376-3385, 1985.

CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris.* **Biotechnology,** v. 11, p . 905-910, 1993.

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris.* **Molecular Biotechnology,** v. 16, n. 1, p. 23-52, 2000.

CUNNINGHAM, M. J.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 2, p. 216-222, 1999.

DAY, M. L.; IMAKAWA, K.; ZALESKY, D. D.; KITTOK, R. J.; KINDER, J. E. Effects of restriction of dietary energy intake during the prepubertal period on secretion of luteinizing hormone and responsiveness of the pituitary to luteinizing hormone-releasing hormone in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 62, n. 2, p. 1641-1648, 1986.

DAY, M. L.; IMAKAWA, K.; WOLFE, P. L.; KITTOK, R. J.; KINDER, J. E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. **Biology of Reproduction**, v. 37, n. 5, p. 1054-1065, 1987.

DE VOS, A. M.; ULTSCH, M.; KOSSIAKOFF, A. A. Human growth hormone and extracellular domains of its receptor: crystal structure of the complex. **Science,** v. 255, p. 306-312, 1992.

DELROISSE, J. M.; DANNAU, M.; GILSOUL, J. J.; EL MEJDOUB, T.; DESTAIN, J.; PORTETELLE, D.; THONART, P.; HAUBRUGE, E.; VANDENBOL, M. Expression of a synthetic gene encoding a tribolium castaneum carboxylesterase in *Pichia pastoris.* **Protein Expression and Purification,** v. 42, p. 286-294, 2005.

DÍAZ-TORGA, G. S.; MEJÍA, M. E.; GONZÁLEZ-IGLESIAS, A.; FORMÍA, N.; BECÚ-VILLALOBOS, D.; LACAU-MENGIDO, I. M. Metabolic cues for puberty onset in free grazing holstein heifers naturally infected with nematodes. **Theriogenology,** v. 56, n. 1, p. 111-122, 2001

DÖRING, F.; KLAPPER, M.; THEIS, S.; DANIEL, H. Use of the glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase promoter for production of functional mammalian membrane transport proteins in the yeast *Pichia pastoris.* **Biochemichal and Biophysical Research Communications,** v. 250, p. 531-535, 1998.

DYER, C. J.; SIMMONS, J. M.; MATTERI, R. L.; KEISLER, D. H. Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissue and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, p. 119-128, 1997a.

DYER, C. J.; SIMMONS, J. M.; MATTERI, R. L.; KEISLER, D. H. cDNA cloning and tissue-specific gene expression of ovine leptin, NPY-Y1 receptor, and NPY-Y2 receptor. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, n. 5, p. 295-303, 1997b.

EGLI, T.; VAN DIJKEN, J.P.; VEENUIS, M.; HARDER, W.; FIECHTER, A. Methanol metabolism in yeast: regulation of the synthesis of catabolic enzymes. **Archives of Microbiology,** v. 124, p. 115-121, 1980.

EHRHARDT, R. A.; SLEPETIS, R. M.; SIEGAL-WILLOTT, J.; VAN AMBURGH, M. E.; BELL, A.W.; BOISCLAIR, Y. R. J. Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. **Endocrinology**, v. 166, n. 3, p. 519-528, 2000.

ELLIS, S. B.; BRUST, P. F.; KOUTZ, P. J.; WATERS, A. F.; HARPOLD, M. M.; GINGERAS, T. R. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulateble genes from the yeast *Pichia pastoris.* **Molecular and Cellular biology,** v. 5, p. 1111-1121, 1985.

EVANS, A. C. O.; ADAMS, G. P.; RAWLINGS, N. C. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility,** v. 100, p. 187-194, 1994.

FAWZI, A. B.; ZHANG, H. P.; VAN HEEK, M.; GRAZIANO, M. P. Purification of milligram quantities of human leptin from recombinant *E. coli.* **Hormone and Metabolic Research,** v. 28, p. 694-697, 1996.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature,** v. 395, p. 763-770, 1998.

FRIES, L. A.; BRITO, F. V.; ALBUQUERQUE, L. G. Possíveis conseqüências de selação para incrementar pesos às idades-padrão vs. reduzir idades para produzir uniades de mercado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33., 1996, Fortaleza. **Anais…** Fortaleza: SBZ, 1996. p. 310-312.

FRISCH, R. E.; WYSHAK, G.; VINCENT, L. Delayed menarche and amenorrhea in ballet dancers. **New England Journal of Medicine,** v. 3003, p. 17-9, 1980.

FOSTER, D. L.; OLSTER, D. H ; Effect of restricted nutrition on puberty in the lamb: patterns of tonic luteinizing hormone (LH) secretion and competency of the LH surge system , **Endocrinology**, v. 116, n. 1, p. 375-81, 1985.

GARCIA-MAYOR, R. V.; ANDRADE, M. A.; RIOS, M.; LAGE, M.; DIEGUEZ, C.; CASANUEVA, F. F. Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, p. 2849-2855, 1997.

GARCIA, M. R.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, S. W.; STANKO, R. L.; MORRISON, C. D.; KEISLER, D. H.; NIZIELSKI, S. E.; WILLIAMS, G. L. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 8, p. 2158-2167, 2002.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology Technology**, v. 54, p. 741-750, 2000.

GELLISSEN, G.; MELBER, K. Methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* as production organism for recombinant pharmaceuticals. **Drug Research,** v. 46, p. 943-948, 1996.

GERTLER, A. Preparation of recombinant bovine, porcine, and porcine W4R/R5K leptins and comparison of their activity and immunoreactivity with ovine, chicken, and human leptins. **Protein Expression and Purification**, v. 19, p. 30-40, 2000.

GERTLER, A.; SIMMONS, J.; KEISLER, D. H. Large-scale preparation of biologically active recombinant ovine obese protein (leptin). **FEBS Letters**, v. 422, p. 137-140, 1998.

GOLDEN, P. L.; MACCAGNAN, T. J.; PARDRIDGE, W. M. Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. **Journal of Clinical Investigation,** v. 99, n. 1, p. 14–18, 1997.

GUISEZ, Y.; FACHÉ, I. L.; CAMPFIELD, A.; SMITH, F. J.; FARID, A.; PLAETINCK, G.; VAN DER HEYDEN, J.; TAVERNIER, J.; FIERS, W.; BURN, P.; DEVOS, R. Efficient secretion of biologically active recombinant ob protein (leptin) in *Escherichia coli*, purification from the periplasm and characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 12, p. 249–258, 1998.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal.** 7. ed. São Paulo: Editora Manole, 2004. 513 p.

HENRY, A.; MASTERS, C. L.; BEYREUTHER, K.; CAPPAI, R. Expression of human amyloid precursor protein ectodomains in *Pichia pastoris:* analysis of culture conditions, purification, and characterization. **Protein Expression and Purification,** v. 10, p. 283-291, 1997.

HIGGINS, D. R.; CREGG, J. M. (Ed.). **Methods in molecular biology**: *Pichia p*rotocols. Totowa, NJ: Humana Press, 1998. 270 p.

HILL, C. P.; OSSLUND, T. D.; EISENBERG, D. The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 90, p. 5176-5171, 1993.

HOHENBLUM, H.; MAURER, M.; MATTANOVICH, D. Dynamics of growth, viability and product formation in recombinant *Pichia pastoris* fermentations. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION WITH PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC CELLS, 2., 2002, Cernobbio, Italy. 2002.

HOLLENBERG, C. P.; GELLISSEN, G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. **Current Opinion Biotechnology,** v. 8, p. 554-560, 1997.

HOUSEKNECHT, K. L.; PORTOCARRERO, C. P. Leptin and its receptors: Regulators of whole-body energy homeostasis, **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15 , n. 6 p. 457-475,1998.

HOUSEKNECHT, K. L.; MANTZOROS, C. S.; KULIAWAT, R.; HADRO, E.; FLIER, J. S.; KAHN, B. B. Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity**. Diabetes,** v. 45, n. 11, p. 1638-43, 1996.

IQBAL, J.; POMPOLO, S.; MURAKAMI, T.; GROUZMAN, E.; SAKURAI, T.; MEISER, B.; CLARKE, I. J. Immunohistochemical characterization of localization of long-form leptin receptor (OB-Rb) in neurochemically defined cells in the ovine hypothalamus. **Brain Research,** v. 920, p. 55-64, 2001.

IMAKAWA, K.; DAY, M. L.; .ZALESKY, D. D.; GARCIAWINDER, M.; KITTOK, R. J. KINDER, J. E. Influence of dietary-induced weight changes on serum luteinizing hormone, estrogen and progesterone in the bovine female. **Biology Reproduction, v.** 35, p. 377, 1986b.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário.** Rio de Janeiro, RJ, 2006.

IWASE, M.; KIMURA, K.; SASAKI, N.; KOMAGOME, R.; ISHIOKA, K.; MORIMATSU, M.; MURAKAMI, T.; SAITO, M. Canine leptin: cDNA cloning, expression and activitu of recombinant protein. **Research in Veterinary Science,** v. 68, p. 109-114, 2000.

JEONG, K. J.; LEE, S. Y. High-level production of human leptin by fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* and its purification. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 65, p. 3027-3032, 1999.

JEONG, K. J.; CHOI, J. H.; YOO, W. M.; KEUM, K. C.; YOO, N. C.; LEE, S. Y.; SUNG, M. H. Constitutive production of human leptin by fed-batch culture of recombinant *rpoS Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification,** v. 36, p. 150-156, 2004.

JI, S.; WILLIS, G. M.; SCOTT, R. R.; SPURLOCK, M. E. Partial cloning and expression of bovine leptin gene. **Animal Biotechnology,** v. 9, p. 1-14, 1998.

KADOKAWA, H.; BLACHE, D.; MARTIN, G. B. Plasma leptin concentrations correlate with luteinizing hormone secretion in early postpartum Holstein cows. **Journal of Dairy Science,** v. 89, p. 3020-3027, 2006.

KALRA S. P.; KALRA P. S. Nutritional infertility: the role of the interconnected hypothalamic neuropeptide Y-galanin-opioid network, **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 17, n. 4, p. 371-401, 1996.

KALRA S. P.; DUBE, M. G.; PU, S.; XU, B.; HORVATH, T. L.; KALRA, P. S Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. **Endocrinology Review,** v. 20, n. 1, p. 68-100, 1999.

KARLSSON, C.; LINDELL, K.; SVENSSON, E.; BERGH, C.; LIND, P.; BILLIG, H.; CARLSSON, L. M.; CARLSSON, B. Expression of functional leptin receptors in the human ovary **Journal Clinical Endocrinol Metabolism, v.** 82, n. 12, p. 4144-8, 1997.

KIESS, W. A.; REICH, K.; MEYER, K.; GLASOW, A.; DEUTSCHER, J.; KLAMMT, J.; YANG, Y.; G. MÜLLER , G. Role for Leptin in Sexual Maturation and Puberty?, J. Kratzsch **Hormones Research,** v. 51, p. 55-63, 1999.

KIM, H.; CHI, Y.; CHUNG, K.; KIM, K.; CHOI, Y.; BAIK, M. Differential response of obese gene expression from fasting in bovine adipose tissues. **Bioscience Biotechnology Biochemistry,** v. 64, p. 2240-2242, 2000.

KINDER, J. E .; DAY, M. L.; KITTOK, R. J. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes**. Journal Reproduction Fertility Supplement,** v. 34, p. 167-86, 1987.

KINDER, J. E.; BERGFELD, E. G.; WEHRMAN, M. E.; PETERS, K. E.; KOJIMA, F. N. Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 393-407, 1995. Supplement.

KING, L. A.; POSSEE, R. D. **The baculovirus expression system**: a laboratory guide. New York, NY: Chapman and Hall, 1992.

KOBAYASHI, K.; KUWAE, S.; OHYA, T.;OHDA, T.; OHYAMA, M.; TOMOMITSU, K. Addition of oleic acid increases expression of recombinant human serum albumin by the *AOX2* promoter in *Pichia pastoris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering,** v. 89, p. 479-484, 2000.

KOUTKIA, P.; CANAVAN, B.; JOHNSON, M. L.; DePAOLI, A.; GRINSPOON, S. Characterization of leptin pulse dynamics and relationship to fat mass, growth hormone, cortisol, and insulin. **American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism,** v. 285, p. E372-E379, 2003.

KOUTZ, P. J.; DAVIS, G. R.; STILLMAN, C.; BARRINGER, K.; CREGG, J. M.; THILL, G. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. **Yeast**, v. 5, p. 167-177, 1989.

LABORDE, C.; CHEMARDIN, P.; BIGEY, F.; COMBARNOUS, Y.; MOULIN, G.; BOZE, H. Overexpression of ovine leptin in *Pichia pastoris*: physiological yeast response to leptin production and characterization of the recombinant hormone. **Yeast,** v. 21, p. 249-263, 2004.

LI, P.; ANUMANTHAN, A.; GAO, X. G.; ILANGOVAN, K.; SUZARA, V. V.; DÜZGÜNES, N.; RENUGOPALAKRISHNAN, V. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris.* **Apllied Biochemestry and Biotechnology,** v. 142, p. 105-124, 2007.

LI, J.; ZHU, S.; ZHANG, Y.; CHI, Y. J.; TANG, J. G.; YANG, J. C. Human leptina dimerization during refolding is predominantly mediated by Cys146-Cys146 intermolecular disulfide bond. **Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology,** v. 25, p. 333-338, 2009.

LI, C.; SUN, Y.; YI, K.; MA, Y.; SUN, Y.; ZHANG, W.; ZHOU, X. Detective of nerve growth factor (NGF) in ejaculated bovine sperm, and the effects of NGF on sperm function. **Theriogenology**, v. 74, p. 1615-1622, 2010.

LIBEREK, K.; LEWANDOWSKA, A.; ZIETKIEWICZ, S. Chaperones in control of protein disaggregation. **EMBO Journal,** v. 27, p. 328-335, 2008.

LIN, J.; BARB, C. R.; MATTERI, R. L.; KRAELING, R. R.; CHEN X.; MEINERSMANN, R. J.; RAMPACEK, G. B. Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary, and other tissues in the pig. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 19, n. 1, p. 53-61, 2000.

LIN, J.; RICHARD, B. C.; KRAELING, R.R.; RAMPACEK, G. B. Developmental changes in the long form leptin receptor and related neuropeptide gene expression in the pig brain. **Biology of Reproduction,** v. 64, n. 6, p. 1614-8, 2001.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data usong real-time quantitative PCR and the 2 (-Delta Delat C(T)) method. **Methods,** v. 25, p. 402-408, 2001.

LOMBARDI, A.; BURSOMANNO, S.; LOPARDO, T.; TRAINI, R.; COLOMBATTI, M.; IPPOLITI, R.; FLAVELL, D. J.; FLAVELL, S. U.; CERIOTTI, A.; FABBRINI, M.S. *Pichia pastoris* as a host for secretion of toxic saporin chimeras. **FASEB Journal,** v. 24, p. 253-265, 2010.

MÁČAJOVÁ, M.; LAMOŠOVÁ, D.; ZEMAN, M. Role of leptin in farm animals: a review. **Journal of Veterinary Medicine,** v. 51, p. 157-166, 2004.

MACIEL, M. N.; ZIEBA, D. A.; AMSTALDEN, M.; KEISLER, D. H.; NEVES, J. P.; WILLIAMS, G. L. Chronic administration of recombinant ovine leptin in growing beef heifers: Effects on secretion of LH, metabolic hormones, and timing of puberty. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 10, p. 2930-2936, 2004a.

MACIEL, M. N.; ZIEBA, D. A.; AMSTALDEN, M.; KEISLER, D. H.; NEVES, J. P.; WILLIAMS, G. L. Leptin prevents fasting-mediated reductions in pulsatile secretion of luteinizing hormone and enhances its gonadotropin-releasing hormone-mediated release in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 1, p. 229-235, 2004b.

MAFFEI, M.; HALAAS, J.; RAVUSSIN, E.; PRATLEY, R. E.; LEE, G. H.; ZHANG, Y.; FEI, H.; KIM, S.; LALLONE, R.; RANGANATHAN, S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nature Medicine,** v. 1, n. 11, p. 1155–1161, 1995.

MAGALHÃES, J. D. **Efeito da leptina e da nutrição sobre o perfil de expressão de genes hipotalâmcos em novilhas zebuínas (*Bos taurus indicus*) no início da puberdade.** 2010. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

MANSUR, M.; CABELLO, C.; HERNÁNDEZ, L.; PAÍS, J.; VARAS, L.; VALDÉS, J.; TERRERO, Y.; HIDALGO, A.; PLANA, L.; BESADA, V.; GARCÍA, L.; LAMAZARES, E.; CASTELLANOS, L.; MARTÍNEZ, E. Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnology Letters,** v. 27, p. 339-345, 2005.

MONTANO, E.; OLIVEIRA, M.; RUIZ-CORTEZ, Z. T. Association between leptin, LH and its receptor and luteinization and progesterone accumulation (P4) in bovine granulose cell in vitro. **Reproduction of Domenstic Animals,** v. 44, p. 699-704, 2009.

MONTESINO, R.; GARCIA, R.; QUINTERO, O.; CREMATA, J. A. Variation in N-linked oligosacharide structures on heterologous proteins secreted by methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification,** v. 14, p. 197-207, 1998.

MORAN, C.; QUIRKE, J. F.; ROCHE, J. F. Puberty in heifers: a review. **Animal Reproduction Science,** v. 18, p. 167-182, 1989.

MORTON, C. L.; POTTER, P. M. Comparison of *Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, Spodoptera frugiperda,* and COS7 cells for recombinant gene expression. **Molecular Biology,** v. 16, p. 193-202, 2000.

MOUNZIH, K.; LU, R.; CHEHAB, F. F. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese *ob/ob* males. **Endocrinology,** v. 138, n. 3, p. 1190-1193, 1997.

MÜNZBERG, H.; MYERS, M. G. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance .**National Neuroscience,** v. 8, n. 5, p. 566-70, 2005.

MURASHITA, K.; UJI, S.; YAMAMOTO, T.; R∅NNESTAD, I.; KUROKAWA, T. Production of recombinant leptin and its effects on food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus* mykiss). **Comparative Biochemistry and Physiology - part B: Biochemistry and Molecular Biology,** v. 150, p. 377-384, 2008.

MYERS, M. G.; COWLEY, M. A.; MÜZBERG, H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. **Annual Review of Physiology,** v. 70, p. 537-556, 2008.

NAGATANI, S.; ZENG, Y.; KEISLER, D. H.; FOSTER, D. L.; JAFFE C. A. Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. **Endocrinology**, v. 141, n. 11, p. 3965-3975, 2000.

NEUBAUER, P.; WINTER, J. Expression and fermentation strategies for recombinant protein production in *Escherichia coli*. In: NEUBAUER, P.; WINTER, J. **Recombinant protein production with prokaryotic and eukaryotic cells**: a comparative view on host physiology. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001. p. 55-73.

NEUENSCHWANDER, S.; RETTENBERGER, G.; MEIJERINK, E.; JORG, H.; STRANZINGER, G. Partial characterization of porcine obesity gene (OBS) and its localization to chromosome 18 by somatic cell hybrids. **Animal Genetics**, v. 27, p. 275-278, 1996.

OLIVEIRA, C. M. G.; OLIVEIRA FILHO, B. D.; GAMBARINI, L. M.; KUNZ, T. L.; VIU, M. A. Índice de gestação em novilhas Nelore que atingiram a puberdade em idade precoce. **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 237-239, 2003.

OYEDIPE, E. O.; VOH, A. A.; MARIRE, B. N.; PATHIRAJA, N. Plasma progesterone concentrations during the oestrus cycle and following fertile and non-fertile inseminations of zebu heifers. **Brazilian Veterinary Journal,** v. 142, p. 41-46, 1986.

PALOU, M.; PICÓ, C.; McKAY, J. A.; SÁNCHEZ, J.; PRIEGO, T.; MATHERS, J. C.; PALOU, A. Protective effects of leptin during the suckling period against later obesity may be associated with changes in promoter methylation of the hypothalamic proopiomelanocortin. **British Journal of Nutrition,** v. 106, p. 769-778, 2011.

PARK, J. H.; LEE, H. H.; NA, S. Y. et al. Recombinant expression of biologically active rat leptin in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification,** v. 22, p. 60-69, 2001.

PFISTER-GENSKOW, M. A.; HAYES, H.; EGGEN, A.; BISHOP, M. D. Chromosomal localization of the bovine *obese* (OB) gene. **Mammalian Genome,** v. 7, p. 398-399, 1996.

PICO, C.; OLIVER, P.; SANCHEZ, J.; MIRALLES, O.; CAIMARI, A.; PRIEGO, T.; PALOU, A. The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. **Internation Journal of Obesity,** v. 31, p. 1199-1209, 2007.

QIAN, H,; BARB, C. R.; COMPTON, M. M .; HAUSMAN, G. J.; AZAIN, M. J.; KRAELING, R. R.; BAILE, C. A. Leptin mRNA expression and serum leptin concentrations as influenced by age, weight, and estradiol in pigs. **Domestic Animal Endocrinology, v.** 16, n. 2, p. 135-143, 1999.

QUINTON, N. D.; SMITH, R.; CLAYTON, P.; GILL, M.; SHALET, S.; JUSTICE, S. K.; SIMON, S. A.; WALTERS, S.; POSTEL-VINAY, M. C.; BLAKEMORE, A. I. F. Leptin binding activity changes with age: the link between leptin and puberty. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, n. 7, p. 2336-2341, 1999.

RAWLINGS, N. C.; EVANS, A. C. O.; HONARAMOOZ, A.; BARTLEWSKI, P. M. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 259-270, 2003.

REDMER, D. A.; CHRISTENSON, R. K.; FORD, J. J.; DAY, B.N. Effect of unilateral ovariectomy on compensatory ovarian hypertrophy, peripheral concentrations of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian venous concentrations of estradiol-17β in prepubertal gilts. **Biology of Reproduction,** v. 31, p. 59, 1984.

RODRIGUES, H. D.; KINDER, J. E.; FITZPATRICK, L. A. Estradiol regulation of luteinizing hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at different ages. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 3, p. 603-609, 2002.

RUIZ-CORTES, Z. T.; MARTEL-KENNES, Y.; GEVRY, N. Y.; DOWNEY, B. R.; PALIN, M. F.; MURPHY, B. D**.** Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 3, p. 789-796, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.

SANTOS, J. E. P.; AMSTALDEN, M. Effects of nutrition on bovine reproduction. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS,** v. 26, n. 1, p. 1077-1088, 1998.

SANTOS, J. E. P.; SÁ FILHO, M. F. Nutrição e Reprodução de Bovinos. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., 2006, Londrina. **Anais...** Londrina. 2006. p. 30-54.

SANTOSO, A.; HERAWATI, N.; RUBIANA, Y. Effect of methanol induction and incubation time on expression of human erythropoietin in methylotrophic yeast *Pichia pastoris.* **Makara Teknologi,** v. 16, p. 29-34, 2012.

SARKAR, M.; SCHILLFARTH, S.; SCHAMS, D.; MEYER, H. H. D.; BERISHA, B. The expression of leptin and its receptor during different physiological stages in the bovine ovary. **Molecular Reproduction and Development,** v.77, p.174-181, 2009.

SAS. Institute. **SAS/STAT User's guide**. Version 8. 6th ed. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2000.

SBERNA, G.; CAPPAI, R.; HENRY, A.; SMALL, D. H. Advantages of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for high-level expression and purification of heterologous proteins. **Australian Journal of Biotechnology,** v. 6, p. 282-287, 1996.

SCARPACE, P. J.; NICOLSON, M.; MATHENY, M. UCP2, UCP3 and leptin gene expression: Modulation by food restriction and leptin. **Journal of Endocrinology,** v. 159, p. 349-357, 1998.

SCHILLO, K. K. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. **Journal of Animal Science,** v. 70, p. 1271-1282, 1992.

SCORER, C. A.; BUCKHOLZ, R. G.; CLARE, J. J.; ROMANOS, M. A. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene,** v. 136, p. 111-119, 1993.

SEARS, I. B.; O'CONNOR, J.; ROSSANESE, O. W.; GLICK, B. S. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris.* **Yeast,** v. 14, p. 783-790, 1998.

SHEN, S.; SULTER, G.; JEFFRIES, T. W.; CREGG, J. M. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. **Gene,** v. 216, p. 93-102, 1998.

SILVA, J. A.II V.; DIAS, L. T.; ALBUQUERQUE, L. G.; Estudo genético da precocidade sexual de novilhas em um rebanho Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v. 34, n. 5, p. 1568-1572, 2005.

SIVITZ, W. I.; BAILEY, H. L.; DONOHOUE, P. Rat adipose ob mRNA levels in states of altered circulating glucose and insulin. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 220, p. 520-525, 1996.

SORENSEN, M. A.; PEDERSEN, S. Absolute *in vivo* translation rates of individual codons in *E. coli*: the two glutamic acid codons GAA and GAG are translated with a threefold difference in rate. **Journal of Mollecular Biology,** v. 222, p. 265-280, 1991.

SPICER, L. J.; FRANCISCO, C. C. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function, **Endocrinology.** v. 138, n. 8, p.3374-9, 1997.

SPICER, L. J.; FRANCISCO, C. C. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis, **Biology Reproduction** v. 58, n. 1, p. 207-12, 1998.

SPICER, L. J. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. **Domestic Animal Endocrinology,** v. 21, n. 4, p. 251-270, 2001.

STARR, R.; WILLSON, T. A.; VINEY, E. M.; MURRAY, L. J.; RAYNER, J. R.; JENKINS, B. J.; GONDA, T. J.; ALEXANDER, W. S.; METCALF, D.; NICOLA, N. A.; HILTON, D. J. A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. **Nature,** v. 387, p. 917-921, 1997.

STEPHENS, T.; BASINSKI, M.; BRISTOW, P.; BUE-VALLESKEY, J.; BURGETT, S.; CRAFT, L.; HALE, J.; HOFFMAN, J.; HSIUNG, H.; KRIAUCIUNAS, A.; MACKELLAR, W.; ROSTECK JR., P.; SCHONER, B.; SMITH, D.; TINSLEY, F.; ZHANG, X.; HEIMAN, M. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. **Nature,** v. 377, p. 530-532, 1995.

STRASSER, A. W. M.; GELLISSEN, G. Yeast expression systems and their competitive environment. **Pharm Manuf Int,** v. 3, p. 151-152, 1998.

SUDBERY, P. E. The expression of recombinant proteins in yeasts. **Current Opinion Biotechnology,** v. 7, p. 517-524, 1996.

SULLIVAN, S. D.; MOENTER, S. M. γ-aminobutyric acid neurons integrate and rapidly transmit permissive and inhibitory metabolic cues to gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocrinology,** v. 145, p. 1194-1202, 2004.

SWAIN, J. E.; DUNN, R. L.; McCONNELL, D.; GONZALEZ-MARTINEZ, J.; SMITH, G. D. Direct effects of leptin on mouse reproductive function: regulation of follicular, oocyte, and embryo development. **Biology of Reproduction,** v. 71, p. 1446-1452, 2004.

TAI, H. C.; SCHUMAN, E. M. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction, **Nature Reviews Neuroscience,** v. 9, p. 826-838, 2008.

TANG, J. G.; TSOU, C. L. The insulin A and B chains contain structural information for the formation of the native molecule. Studies with protein disulphide-isomerase. **Biochemichal Journal,** v. 268, p. 429-435, 1990.

TANIGUCHI, Y.; ITOH, T.; YAMADA, T.; SASAKI, Y. Genomic structure and promoter analysis of the bovine leptin gene. **IUBMB Life,** v. 53, p. 131-135, 2002.

TARTAGLIA, L. A. The leptin receptor. **Journal of Biological Chemistry,** v. 272, p. 6093-6096, 1997.

TARTAGLIA, L. A.; DEMBSKY, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G. J.; CAMPFIELD, L. A.; CLARK, F. T.; DEEDS, J.; MUIR, C.; SANKER, S.; MORIARTY, A.; MOORE, K. J.; SMUTKO, J. S.; MAYS, G. G.; WOOL, E.

A.; MONROE, C. A.; TEPPER, R. I. Identification and expression cloning of leptin receptor, OB-R. **Cell,** v. 83, p. 1263-1271, 1995.

THALLMAN, R. M.; CUNDIFF, L. V.; GREGORY, K. E.; KOCH, R. M. Germplasm evaluation in beef cattle – cycle IV: Post weaning growth and puberty in heifers. **Journal of Animal Science,** v. 77, p. 2651-2659, 1999.

THILL, G. P.; DAVIS, G. R.; STILLMAN, C.; HOLTZ, G.; BRIERLEY, R.; ENGEL, M.; BUCKHOLTZ, R.; KINNEY, J.; PROVOW, S.; VEDVICK, T.; SEIGEL, R. S. Positive and negative effects of multi-copy integrated expression vectors on protein expression in *Pichia pastoris.* In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON GENETICS OF INDUSTRIAL MICROORGANISMS, 6., 1990, Strasburg. **Proceedings…** Paris: Société Française de Microbiologie, 1990. p. 477-490.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Projeto Genoma do Câncer,** 2000. p. 20.

TRIMBLE, R. B.; ATKINSON, P. H.; TSCHOPP, J. F.; TOWNSEND, R. R.; MALEY, F. Structure of oligossacharides on Saccharomyces SUC2 invertase secreted by the methylotrophic yeast Pichia pastoris. **Journal of Biological Chemistry,** v. 266, p. 22807-22817, 1991.

TSCHOPP, J. F.; BRUST, P. F.; CREGG, J. M.; STILLMAN, C. A.; GINGERAS, T. R. Expression of *lacZ* gene from two methanol-regulated promoter in *Pichia pastoris*. **Nucleic Acids Research,** v. 15, p. 3859-3876, 1987.

VAICIUNAS, A. **Expressão de genes hipotalâmicos em novilhas Nelore precoces e não precoces**. 2007. 65 p. (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina VUniversidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

VAICIUNAS, A.; COUTINHO, L. L.; MEIRELLES, F. V.; PIRES, A. V.; SILVA, L. F. P. Leptin and hypothalamic gene expression in early- and late-maturing *Bos indicus* Nellore heifers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 657-664, 2008.

VARNERIN, J. P.; SMITH, T.; ROSENBLUM, C. I.; VONGS, A.; MURPHY, B. A.; NUNES, C.; MELLIN, T. N.; KING, J. J.; BURGESS, B. W.; JUNKER, B.; CHOU, M.; HEY, P.; FRAZIER, E.; MacINTYRE, D. E.; VAN DER PLOEG, L. H.; TOTA, M. R. Production of leptin in *Escherichia coli:* a comparison methods. **Protein Expression and Purification,** v. 14, p. 335-342, 1998.

VASSILEVA, A.; CHUGH, D. A.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *P. pastoris* using the GAP promoter. **Journal of Biotechnology,** v. 88, p. 21-35, 2001.

VEENHUIS, M.; VAN DIJKEN, J. P.; HARDER, W. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. **Advances in Microbial Physiology,** v. 24, p. 1-82, 1983.

WAGNER, R.; GEYER H.; GEYER, R.; KLENK, H. D. N-acetyl-beta-glucosaminidase accounts for differences in glycosilation if influenza virus hemaglutinin expressed in insect cells from a baculovirus vector. **Journal of Virology,** v. 70, p. 4103-4109, 1996.

WANG, S. H.; YANG, T. S.; LIN, S. M.; TSAI, M. S.; WU, S. C.; MAO, S. J. Expression, characterization, and purification of recombinant porcine lactoferrin in *Pichia pastoris.* **Protein Expression and Purification,** v. 25, p. 41-49, 2002.

WERTEN, M. W.; VAN DEN BOSCH, T. J.; WIND, R. D.; MOOIBROEK, H.; DE WOLF, F.A. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. **Yeast,** v. 15, p. 1087-1096, 1999.

WHITE, C. E.; KEMPI, N. M.; KOMIVES, E. A. Expression of highly disulfide-bonded proteins in *Pichia pastoris.* **Structure,** v. 2, p. 1003-1005, 1994.

WILLIAMS, G. L.; AMSTALDEN, M.; GARCIA, M. R.; STANKO, R. L.; NIZIELSKI, S. E.; MORRISON, C. D.; KEISLER, D. H. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Domestic Animal Endocrinology,** v. 23, p. 339-349, 2002.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science,** v. 82, p. E63-E74, 2004.

WU, F. C.; BUTLER, G. E.; KELNAR, C. J.; HUHTANIEMI, I.; VELDHUIS, J. D. Ontogeny of pulsatile gonadotropin releasing hormone secretion from midchildhood, through puberty, to adulthood in the human male: a study using deocnvolution analysis and an ultrasensitive immunofluorometric assay. **Journal of Clinical Endocrinology and metabolism,** v. 81, p. 1798-1805, 1996.

LIU, X.; LIU, F.; QI, H.; ZOU, Q. Human leptin expressed in *Pichia pastoris* yeast and purification. **Journal of Chongqing Medical Universtity**, n. 3, p. 250-252, 2002.

YACOBOVITZ, M.; SOLOMON, G.; GUSAKOVSKY, E.E.; LEVAVI-SIVAN, B.; GERTLER, A. Purification and characterization of recombinant pufferfish (Takifugu rubripes) leptin. **General and Comparative Endocrinology,** v. 156, p. 83-90, 2008.

YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F.; STEWART, C. N. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics,** v. 7, p. 85-97, 2006.

ZAMORANO, P. L.; MAHESH, V. B.; DE SEVILLA, L. M.; CHORICH, L. P.; BHAT, G. K.; BRANN, D. W. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat**. Neuroendocrinology,** v. 65, p. 223-228, 1997.

ZAHN, K. Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. **Journal of Bacteriology,** v. 178, p. 2926-2933, 1996.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue **Nature,** v. 372, p. 425-32, 1994.

ZHANG, F.; BASINSKI, M. B.; BEALS, J. M.; BRIGGS, S. L.; CHURGAY, L. M.; CLAWSON, D. K.; DIMARCHI, R. D.; FURMAN, T. C.; HALE, J. E.; HSIUNG, H. M.; SCHONER, B. E.; SMITH, D. P.; ZHANG, X. Y.; WERY, J. P.; SCHWEITZ, R. W. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. **Nature**, v. 387, p. 206-209, 1997.

ZHANG, A. L.; LUO, J. X.; ZHANG, T. Y.; PAN, Y. W.; TAN, Y. H.; FU, C. Y.; TU, F. Z. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. **Molecular Biology Reports,** v. 36, p. 1611-1619, 2009.

ZIEBA, D. A.; AMSTALDEN, M.; MORTON, S.; MACIEL M. N.; KEISLER, D. H.; WILLIAMS, G. L. Regulatory roles of leptin at the hypothalamic-hypophyseal axis before and after sexual maturation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 3, p. 804–812, 2004.