INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Expressão e caracterização do hormônio folículo estimulante (FSH) de pirarucu
(Arapaima gigas)**

THAIS CRISTINA DOS ANJOS SEVILHANO

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientadora:
Profa. Dra. Cibele Nunes Peroni**

**São Paulo
2019**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Expressão e caracterização do hormônio folículo estimulante (FSH) de
pirarucu (Arapaima gigas)**

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

Thais cristina dos Anjos Sevilhano

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientadora:
Profa. Dra. Cibeles Nunes Peroni**

**São Paulo
2019**

Fonte de Financiamento: CNPq

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte:

Como citar:

SEVILHANO, T.C.A. ***Expressão e caracterização do hormônio folículo estimulante (FSH) de pirarucu (Arapaima gigas)***. 2019. 57 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: www.teses.usp.br (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Sevilhano, Thais Cristina dos Anjos.

Expressão e caracterização do hormônio folículo estimulante (FSH) de pirarucu (*Arapaima gigas*) / Thais Cristina dos Anjos Sevilhano; orientadora Cibele Nunes Peroni. - - São Paulo, 2019.

57 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Aplicações) - - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.

1. *Arapaima gigas*. 2. Hormônio folículo estimulante. 3. HEK293. I. Peroni, Cibele Nunes, orient. II.Título.

Universidade de São Paulo
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

Janus**CERTIFICADO DE DEFESA**

CERTIFICO, para os devidos fins, que Sr(a). Thais Cristina dos Anjos Sevilhano, número USP 8502599, defendeu no dia 17 de julho de 2019, no Programa de Tecnologia Nuclear do(a) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo, a Tese de Doutorado intitulada:

"Expressão e caracterização do hormônio folículo estimulante (FSH) de pirarucu (*Arapaima gigas*)"

CERTIFICO, ainda, que o(a) aluno(a) faz jus ao título de Doutora em Ciências - Área: Tecnologia Nuclear - Aplicações, tendo sido a ata da Comissão Julgadora homologado pela Comissão de Pós-Graduação, em 17 de julho de 2019.

São Paulo, 17 de julho de 2019.

Roberto Frajndlich
Gerente de Ensino
IPEN-CNEN/SP

DEDICO ESTE TRABALHO:

Ao meu pai, Walter Sevilhano, por ter me dado o maior presente que alguém poderia dar a outra pessoa: ele acreditava em mim.

Ao meu pai científico, Dr. Paolo Bartolini, por todo suporte intelectual e emocional ao longo desses 8 anos de vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço à minha mãe, Helaine Sevilhano e ao meu irmão, Felipe Sevilhano por nunca terem soltado minha mão.

À Dra. Cibele Nunes Peroni, pela oportunidade de fazer parte dessa equipe, por todo apoio em todas as fases desse trabalho

Ao Dr. Carlos Roberto Jorge Soares, por ter me aceitado como aluna durante minha primeira visita ao Cebio e por ter feito parte de todas as etapas da minha vida acadêmica.

Ao Dr. João Ezequiel de Oliveira, por todo tempo dedicado a esse trabalho e por oferecer sua ajuda em todos os momentos.

À Eliana Lima, Thais Caramori, Renan Freire, Felipe Douglas e Amanda por fazerem parte do grupo *Arapaima gigas* direta ou indiretamente. Por todo apoio e por serem os melhores amigos que alguém poderia ter. Seria realmente impossível sem vocês.

Aos meus amigos Yago Xaras e Carol Pedroso, por todo suporte nos bastidores, por me fazer esquecer dos problemas e me arrancar um sorriso toda vez que me senti pessimista.

Aos meus queridos amigos: Alissandra, Eliza, Flavinha, Renata, Patrícia, Paulo Victor, Nélío, Gustavo, Enio, Darle e Vanessa por todo carinho, amizade e momentos compartilhados. Vocês moram no meu coração.

Ao Junqueira, por me ouvir diariamente durante as caronas e me fazer rir com sua implicância, por todo suporte técnico e por sempre estar disponível para o que for preciso.

Aos amigos do Centro de Biotecnologia: Dra. Kayo, Dra. Regina, Dra. Teresa, Rosângela, Longino, Dr. Daniel Perez, Podé, Luma, Priscila, Ana Lígia, Ana Cristina, Fúlvio, Kleice, Letícia, Mayele, Neide, Rute, Arlete, Renata, Ivette, Fernanda, Beatriz.

Aos pesquisadores parceiros do nosso grupo, que nos ajudaram e possibilitaram novos conhecimentos: Dr. Vinícius Maltarollo, Dr. Gustavo Trossini, Dra. Riviane Garcez, Dra. Rossana Venturieri, Dr. Lucas Toratti.

Ao Dr. Geraldo Magalhães e Dr. Vincent Viala por terem sido tão solícitos.

À minha família: Leonardo, Silvio, Anair, Carla, Ronaldo, Vinícius e Lucas por me darem a base necessária para chegar até aqui.

Ao Doohan, Rogério, Viviane, Olivia, Vicky e Audrey por me aceitarem de braços abertos em suas vidas.

Aos meus amigos Paula, Thiciani, Leandro, Lud, Sato, pela parceria de vida.

Ao CNPq, FAPESP e IPEN pelo auxílio financeiro e estrutural.

E todos aqueles que o nome não está aqui, mas que estiveram presentes durante alguma etapa do desenvolvimento deste trabalho.

“ O universo te devolve tudo aquilo que você transmite.
Isso te assusta ou te conforta? ”

Autor desconhecido

RESUMO

SEVILHANO, T.C.A. Expressão e caracterização do hormônio folículo estimulante (FSH) de pirarucu (*Arapaima gigas*), 2019. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O *Arapaima gigas*, conhecido popularmente no Brasil como pirarucu, pertence ao grupo mais primitivo dos teleósteos, sendo um dos maiores peixes de água doce da América do Sul. Desde os anos 40 informações divergentes têm sido dadas em relação ao seu tamanho e peso máximo, porém todas concordam com o fato de que se trata de uma espécie de grande porte, com exemplares pesando de 125 a 200 quilos e um comprimento de 2 a 3 metros. Sua carne é desprovida de espinhas e apresenta baixo teor de gordura. Os níveis de rendimento da carcaça são elevados e o crescimento juvenil da espécie é consideravelmente rápido. Por isso, o pirarucu, apresenta um atraente valor de mercado e grande importância para o comércio de pescado amazônico. A pesca predatória tem reduzido significativamente a população dessa espécie nas regiões amazônicas ao longo dos anos. Sendo assim, desde os anos 2000, o pirarucu foi incluído na lista de animais sobre explorados ou em perigo de extinção do IBAMA. A ausência de um empreendimento de aquicultura capaz de produzir o pirarucu a preços competitivos, de forma previsível e em larga escala deve-se principalmente ao fato de que essa espécie, de um modo geral, apresenta dificuldades no processo reprodutivo em cativeiro, apresentando uma ovulação, espermição e/ou maturação final gonadal insatisfatória. O hormônio folículo estimulante (FSH) é um hormônio gonadotrófico que exerce um papel importante na maturação folicular inicial das gônadas. Assim como os mamíferos, os peixes também apresentam hormônios gonadotróficos (GTHs) heterodiméricos, onde a subunidade α é comum entre os hormônios pertencentes a essa família e a subunidade β determina a atividade hormonal específica. As subunidades α e β do hormônio folículo estimulante de *Arapaima gigas* (ag-FSH) foram previamente isoladas pelo nosso grupo de pesquisa ao longo dos anos e possibilitaram um estudo de modelagem tridimensional baseada nas sequências de aminoácidos obtidas. Paralelamente, foi realizada a expressão do ag-FSH recombinante com níveis de rendimento satisfatórios (28 mg/L) através da expressão em células de embrião de rim humano (HEK 293), purificando-o e caracterizando-o a partir de técnicas cromatográficas padronizadas pelo nosso grupo de pesquisa.

Palavras-chave: hormônio folículo estimulante, *Arapaima gigas*, pirarucu, hipófise, HEK293, cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC

ABSTRACT

SEVILHANO, T.C.A. Expression and characterization of follicle stimulating hormone (FSH) of pirarucu (*Arapaima gigas*), 2019. Thesis (PhD) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil 2019.

Arapaima gigas, popularly known in Brazil as pirarucu, belongs to the most primitive group of teleosts, being one of the largest freshwater fish in South America. Since 1940, divergent information has been given regarding its size and maximum weight, but all agree that it is a large species, with specimens weighing from 125 to 200 kilograms and with a 2 to 3 meters of length. Its meat is devoid of fish bones and has low fat content. Carcass yield levels are high and juvenile growth of the species is considerably fast. Therefore, the pirarucu, presents an attractive market value and great importance for the Amazonian fish trade. Predatory fishing has significantly reduced the population of this species in Amazonian regions over the years. Thus, since 2000, pirarucu has been included in IBAMA's list of exploited or endangered animals. The absence of an aquaculture enterprise able to produce pirarucu at competitive prices in a predictable and large scale is mainly because this species, in general, presents difficulties in the reproductive process in captivity, presenting an unsatisfactory ovulation, spermiation and / or late gonadal maturation. The follicle-stimulating hormone (FSH) is a gonadotrophic hormone that plays an important role in the initial follicular maturation of the gonads. Like mammals, fish also have heterodimeric gonadotrophic hormones (GTHs), where the α subunit is common between the hormones belonging to this family and the β subunit determines the specific hormonal activity. The α and β subunits of the follicle stimulating hormone of *Arapaima gigas* (ag-FSH) were previously isolated by our research group over the years and provided a three-dimensional modeling study based on the obtained amino acid sequences. At the same time, the recombinant ag-FSH was expressed with satisfactory yields (28 mg/L) in human kidney embryonic cells (HEK 293), purified and characterized from chromatographic techniques, standardized by our group.

Keywords: follicle stimulating hormone, *Arapaima gigas*, pirarucu, pituitary, HEK293, chromatography.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3.OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4. MATERIAL	23
5. MÉTODOS	25
5.1 Alinhamento da sequência de aminoácidos de FSH β	25
5.2 Modelagem tridimensional e simulação dinâmica molecular relativa ao ag-FSH e ag-LH	25
5.3 Construção do vetor de expressão	27
5.4 Transformação das células competentes pelo método de choque térmico	28
5.5 Purificação de DNA plasmidial	29
5.6 Sequenciamento de DNA plasmidial.....	29
5.7 Transfecção dos vetores de expressão TOPO em células HEK 293 F	30
5.8 Purificação de ag-FSH através de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC).....	30
5.9 Purificação de Ag-FSH através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPSEC).....	31
5.10 Dissociação do heterodímero	31
6 RESULTADOS.....	32
6.1 Alinhamento da sequência de aminoácidos de FSH β	32
6.2 Modelagem tridimensional e simulação dinâmica molecular relativa ao ag-FSH e ag-LH	33
6.3 Purificação de ag-FSH através de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) e cromatografia líquida de exclusão molecular de alta eficiência (HPSEC)	41
6.4 Confirmação da identidade do ag-FSH e dissociação do heterodímero em ácido acético	45
7. DISCUSSÃO	46
8. CONCLUSÃO	51
9. REFERÊNCIAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

O *Arapaima gigas*, conhecido popularmente no Brasil como pirarucu, pertence ao grupo mais primitivo dos teleósteos, sendo um dos maiores peixes de água doce da América do Sul (Godinho *et al.*, 2005). O gênero *Arapaima* surgiu inicialmente na bacia amazônica e atualmente encontra-se distribuído no Brasil, Colômbia, Equador e Peru (Hrbek *et al.*, 2005).

O nome popular “pirarucu” é derivado das palavras tupis “pira” e “urucum” que em português significa “peixe” e “vermelho”, respectivamente. Essa denominação deve-se à coloração de suas escamas caudais e de sua carne predominantemente avermelhada (Godinho *et al.*, 2005).

Através de uma narrativa indígena, Gudger (1943) sugeriu que essa espécie poderia atingir 4.5 metros de comprimento e aproximadamente 180 quilos. Já Goulding (1980) revelou que é comum a existência de exemplares adultos pesando 125 a 200 quilos e um comprimento de 2 a 3 metros. Desde os anos 40 informações divergentes têm sido dadas em relação ao seu tamanho e peso máximo, porém todas concordam com o fato de que se trata de uma das espécies de maior porte.

Sua carne é desprovida de espinhas e apresenta baixo teor de gordura. Os níveis de rendimento da carcaça são elevados e o crescimento juvenil da espécie é consideravelmente rápido. Por isso, o pirarucu, apresenta um atraente valor de mercado e grande importância para o comércio de pescado amazônico (Bayley e Petrere, 1989; Godinho *et al.*, 2005).

A pesca predatória tem reduzido significativamente a população dessa espécie nas regiões amazônicas ao longo dos anos (Ferraris, 2003). Por isso, desde os anos 2000, o pirarucu foi incluído na lista de animais sobre explorados ou em perigo de extinção do IBAMA (Brazil, 2004) e listado no CITES II (Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Selvagens da Fauna e Flora Ameaçadas de Extinção, apêndice II) (http://www.ukcites.gov.uk/pdf_files/FishInvertebrates6.pdf)

A ausência de um empreendimento de aquicultura capaz de criar o pirarucu a preços competitivos, de forma previsível e em larga escala deve-se principalmente ao fato de que essa espécie, de um modo geral, apresenta dificuldades no processo reprodutivo em cativeiro, apresentando uma ovulação, espermição e/ou maturação final gonadal insatisfatória (Fontaine, 1975).

As falências reprodutivas dos vertebrados estão ligadas diretamente a fatores hormonais do eixo hipotálamo-hipófise. As gonadotrofinas (GTHs), que compreendem o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) são glicoproteínas heterodiméricas constituídas por duas subunidades não covalentemente ligadas, as subunidades α e β (Schmitz *et al.*, 2005).

O hipotálamo e a hipófise são estruturas localizadas na base do diencéfalo e são responsáveis pela realização de eventos fisiológicos e neuroendócrinos. Os estímulos externos e internos são captados pelo sistema nervoso central, iniciando assim, a cascata hormonal relacionada à reprodução por meio da liberação dos hormônios liberadores de gonadotrofinas (GnRH) e dopamina, que são de grande importância prática na reprodução induzida em peixes (Mylonas *et al.*, 2010)

Assim como os mamíferos, os peixes também apresentam GTHs heterodiméricas, onde a subunidade α é comum entre os hormônios pertencentes a essa família e a subunidade β determina a atividade hormonal específica (Hurvitz *et al.*, 2005). Durante os anos 2000, Querat e colaboradores (2001) estabeleceram que essa heterodimerização pode ter ocorrido no momento da emergência dos peixes cartilaginosos (condictes), antes da divisão entre Actinopterygians e Sarcopterygians.

As sequências genéticas das subunidades α e β de LH e FSH de *Arapaima gigas* (ag-GTH α , ag-LH β e ag-FSH β , respectivamente), foram obtidas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa. O cDNA de ag-GTH α apresentou um comprimento total de 767 pb com uma região codificante (ORF) de 348 pb que codifica um peptídeo de 115 aminoácidos. A proteína apresenta, portanto, um suposto peptídeo sinal de 24 aminoácidos e um peptídeo maduro de 91 aminoácidos que, quando alinhados com outras espécies de peixes, mostram a conservação de 10 resíduos de cisteínas, 3 prolinas e 2 potenciais sítios de glicosilação conservados (Faria *et al.*, 2013; Sevilhano *et al.*, 2017).

Já a subunidade β de FSH apresentou um comprimento total de 913 pb com uma ORF de 381 pb, codificando uma proteína de 126 aminoácidos com um peptídeo sinal de 18 aminoácidos e um peptídeo maduro de 108 aminoácidos. O ag-FSH β mostrou conter 12 resíduos de cisteínas responsáveis pela formação de 6 pontes dissulfeto, 2 prolinas e 1 sítio de glicosilação perfeitamente conservados quando comparado com outras espécies (Faria *et al.*, 2013; Sevilhano *et al.*, 2017).

Esses dados específicos da espécie estudada possibilitaram estudos no campo filogenético utilizando simultaneamente as sequências de GTH α , FSH β e LH β de diversos peixes que posicionaram o *A. gigas* como grupo irmão dos Clupeocephala e os Elopomorpha como grupo mais basal entre os teleósteos (Faria *et al.*, 2013; Sevilhano *et al.*, 2017).

Levando em consideração os dados obtidos anteriormente, esse trabalho possibilitou a realização de um estudo adicional de modelagem tridimensional baseada nas sequências de aminoácidos obtidas. Paralelamente, foi realizada a expressão do ag-FSH recombinante com níveis de rendimento satisfatórios através de expressão em células de embrião de rim humano (HEK293), purificando-o e caracterizando-o a partir de técnicas cromatográficas e de espectrometria de massa padronizadas pelo nosso grupo ao longo dos anos (Mendonça *et al.*, 2005; Loureiro *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2014).

Dessa forma, deveria ser possível determinar a atividade biológica do ag-FSH frente ao Padrão Internacional Humano de FSH da OMS, analisando o incremento de peso de ovários de ratas após a administração do hormônio recombinante e sintetizar maiores quantidades deste hormônio, colaborando assim diretamente para futuras aplicações veterinárias e ambientais e ampliando a possibilidade de investigação nas áreas endocrinológicas e reprodutivas dessa espécie e de outros teleósteos, seja para um estudo fisiológico que para o estabelecimento de um empreendimento relacionado à reprodução induzida em cativeiro.

2. JUSTIFICATIVA

Ressaltamos que não há relatos na literatura da existência de um ag-FSH recombinante produzido em células HEK293 ou em outros hospedeiros. A produção de um ag-FSH recombinante seria útil para otimização da criação dessa espécie amazônica, que apresenta um declínio populacional ao longo dos anos devido a pesca predatória, como também para desenvolver estudos na área endocrinológica e da reprodução desta mesma espécie.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Expressar, purificar e caracterizar físico-quimicamente e biologicamente o ag-FSH obtido em células HEK 293.

3.2 Objetivos específicos:

- Realizar um alinhamento da sequência de aminoácidos do ag-FSH, obtido pelo grupo anteriormente, com outras 40 espécies de peixe, para identificação de possíveis regiões conservadas e relativa análise.
- Modelagem tridimensional e simulação dinâmica molecular relativas ao ag-FSH e ag-LH baseando-se nas sequências moleculares obtidas pela aluna durante o mestrado.
- Construção de vetores de expressão contendo, separadamente, os genes de ag-FSH α e ag-FSH β em células de mamíferos.
- Produção de ag-FSH em células HEK293 mediante expressão transiente em meio de cultura livre de soro.
- Purificação de ag-FSH através de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) e cromatografia líquida de alta eficiência de exclusão molecular (HPSEC), utilizando técnica anteriormente padronizada pelo grupo na purificação de FSH humano.
- Caracterização de ag-FSH através da dissociação do heterodímero em ácido acético, visualizando as duas subunidades mediante RP-HPLC.

4. MATERIAL

- ✓ Agitador magnético modelo 258 – FANEM (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Agitador rotatório tipo vortex, modelo 162 – MARCONI (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Autoclave vertical, modelo 103 – FABBE-PRIMAR (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Banho-maria, modelo 146, FANEN (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Balança analítica, modelo H20T – METTLER (Zurique, Suíça);
- ✓ Balança analítica, modelo P1000N – METTLER (Zurique, Suíça);
- ✓ Câmara de Neubauer - BOECO (Hamburgo, Alemanha);
- ✓ Centrífuga refrigerada, modelo 22R- BECKMAN COULTER (Brea, CA, EUA);
- ✓ Centrífuga refrigerada automática, modelo Super Speed RC – 2B – SORVALL (Newtown, CT, EUA);
- ✓ Centrífuga refrigerada automática, modelo 5810R, EPPENDORF (Hamburgo, Alemanha);
- ✓ Contador gama automático 2470 Wizard 2, PERKIN ELMER (Waltham, Massachusetts, EUA);
- ✓ Destilador de água, modelo 016, FABBE-PRIMAR (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Estufa de cultura celular, modelo 3159 - FORMA SCIENTIFIC (Marietta, OH, EUA);
- ✓ Espectrofotômetro, modelo Ultraspec 2100 pro, AMERSHAM BIOSCIENCES (Uppsala, Suécia);
- ✓ Fluxo Laminar Calsse II A/B 3, modelo 1140, FORMA SCIENTIFIC (Marietta, Ohio, EUA).
- ✓ Fotodocumentador, modelo Minibis Pro, DNR IMAGE SYSTEMS (Jerusalém, Israel);
- ✓ Fonte de alta tensão para eletroforese, ECPS 3000/150, GE - HEALTHCARE (Buckinghamshire, Inglaterra);
- ✓ Fonte de alta tensão para eletroforese, EPS 600, GE - HEALTHCARE (Buckinghamshire, Inglaterra);
- ✓ Fluxo laminar classe II A/B 3, modelo 1140 - FORMA SCIENTIFIC (Marietta, OH, EUA);
- ✓ Freezer -20° C, modelo 0651 – PROSDÓCIMO (São Paulo, SP, Brasil);

- ✓ Freezer -40° C, modelo AB 240 – METALFRIO (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Freezer -80° C, modelo 8425 – FORMA SCIENTIFIC (Marietta, OH, EUA);
- ✓ Leitor de placas de microtitulação modelo MR 400 DYNATECH, (Bethesda, EUA);
- ✓ Microcentrífuga, modelo 5415P - EPPENDORF (Hamburgo, Alemanha);
- ✓ Microscópio invertido, modelo ID 03 - CARL ZEISS (Oberkochen, Alemanha);
- ✓ Micropipetas LABMATE SOFT Monocanal de volume variável: 10µL, 100 µL, 200 µL e 1000 µL- HTL (Varsóvia, Polônia);
- ✓ Nanodrop - THERMO SCIENTIFIC (Waltham, MA, EUA);
- ✓ Placas de microtitulação com fundo em “U” - DYNATECH (Chantilly, EUA);
- ✓ Ponteiras sem filtro, volumes de 10 a 1000 µL – AXYGEN (Union, EUA);
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q plus – MILLIPORE (Bedford, MA, EUA);
- ✓ Termociclador Veriti 96 poços - APPLIED BIOSYSTEMS (Foster City, CA, EUA);
- ✓ Tubos de poliestireno para imunoenaios (7,5 x 1,2 cm) - EMTEL (São Paulo, Brasil).
- ✓ Agarose – INVITROGEN (Carlsbad, CA, EUA);
- ✓ Ampicilina – SIGMA (St. Louis, MO, EUA);
- ✓ Bactérias competentes XL-1 blue-STRATAGENE/AGILENT TECHNOLOGIES (Santa Clara, CA, EUA);
- ✓ Bactérias competentes XL-2 blue-STRATAGENE/AGILENT TECHNOLOGIES (Santa Clara, CA, EUA);
- ✓ Bactérias competentes da linhagem *E. coli* DH5α;
- ✓ Bactérias competentes da linhagem ZYCY10P35S2T/ZY77 (Dr. Jacob Giehm Mikkelsen, UNIVERSIDADE DE AARHUS (Aarhus, Dinamarca);
- ✓ Brometo de etídio – LKB – PRODUKTER AB (Bromma, Suécia);
- ✓ Enzimas de restrição – FERMENTAS (Burlington, ON, Canadá);
- ✓ Enzima fosfatase alcalina (CIP) - NEW ENGLAND BIOLABS INC. (Ipswich, MA, EUA);
- ✓ Enzima *Herculase II Fusion*- AGILENT TECHNOLOGIES, (La Jolla, CA, EUA);
- ✓ Enzima T4 Ligase HC - PROMEGA (Madison, WI, EUA);
- ✓ Extrato de levedura – DIFCO (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Marcador de peso molecular de 100 pb e 1 kb Gene Ruler™ – FERMENTAS (Burlington, ON, Canadá);

- ✓ Sistema para purificação de DNA miniprep E.Z.N.A - OMEGA BIO-TEK (Norcross, GA, EUA);
- ✓ Sistema para purificação de DNA Xtra Midi/Maxi - NUCLEOBOND - MACHEREY-NAGEL (Düren, Alemanha);
- ✓ Sistema para extração de DNA de gel de agarose E.Z.N.A - OMEGA BIO-TEK (Norcross, GA, EUA);
- ✓ Triptona - Bacto™ Tryptone – BECTON DICKINSON (Sparks, MD, EUA).

5. MÉTODOS

5.1 Alinhamento da sequência de aminoácidos de FSH β

Utilizando a sequência de aminoácidos do ag-FSH β obtida anteriormente pelo nosso grupo (Sevilhano *et al.*, 2017), foi realizado um alinhamento com outras 40 espécies de peixes, retiradas do banco de dados genético (GenBank®). O alinhamento foi realizado através do software MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2013). Todas as posições contendo lacunas foram eliminadas da análise.

5.2 Modelagem tridimensional e simulação dinâmica molecular relativa ao ag-FSH e ag-LH

Todas análises referentes à modelagem tridimensional e simulação dinâmica molecular foram realizadas em parceria com o Departamento da Farmácia, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Os modelos tridimensionais iniciais de ag-GTH α , ag-FSH β e ag-LH β foram gerados utilizando o servidor HHpred (Soding *et al.*, 2005) e o software Modeller (Marti-Renom *et al.*, 2000). Inicialmente o servidor HHpred foi responsável por gerar o alinhamento 1D para as subunidades estudadas com base nas sequências tridimensionais de proteínas disponíveis no Protein Databank (PDB), empregando um método de alinhamento global, combinando-o com a estrutura secundária prevista para estes modelos.

A sequência de ag-GTH α , e de ag-FSH β e ag-LH β foram alinhadas com FSH humano e gonadotrofina coriônica humana (hCG) disponíveis no PDB, apresentando 100% de probabilidade e valores de identidade > 47% quando comparados aos seus respectivos modelos. Após os alinhamentos primários das 3 subunidades, os modelos 3D iniciais foram construídos usando o Software Modeller. Os cinco modelos de energia mais baixa foram escolhidos entre os 60 que foram gerados pelo programa e empregados para obter o modelo ideal para as simulações de Dinâmica Molecular, avaliando sua qualidade estereoquímica através do Ramachandran plotado (Lovell *et al.*, 2002). Ambos heterodímeros foram construídos sobrepondo cada subunidade modelada em seu respectivo modelo cristalográfico.

Após a construção desse modelo dimérico inicial de FSH e LH, foi realizada a simulação da Dinâmica Molecular (MD) desses dois hormônios. Os parâmetros MD foram iguais para os dois modelos gerados, utilizando o software GROMACS v.4.5.4 (Berendesen *et al.*, 1995) e usando um sistema simulatório em que as moléculas de água foram representadas por um modelo de carga de ponto simples. Os grupos carregados utilizaram protonação em pH 7,0 e foram adicionados a um sistema de neutralidade de 0,1 M NaCl.

O Campo de Força de Gromos foi escolhido para as simulações MD em temperatura e pressão constantes. Inicialmente, uma minimização energética baseada em um “algoritmo de descida íngreme” foi utilizada; posteriormente, 20 picosegundos de simulação MD foram aplicados para fixar as posições do esqueleto (backbone) atômico. A temperatura utilizada para o sistema foi de 310° K, simulando uma temperatura fisiológica ideal. Finalmente, uma simulação de MD sem restrições foi realizada em 20 nanosegundos a 310° K para avaliar a estabilidade das estruturas. Durante todas as simulações, a temperatura e pressão (1,0 bar) foram mantidas constantes.

Durante a análise estrutural e validação, o modelo final, gerado pelas simulações MD, foi verificado usando várias análises estruturais através do programa GROMACS, bem como através dos gráficos de Ramachandran foram gerados com o servidor Rampage (Berendesen *et al.*, 1995). O perfil pseudo-energético dos modelos foi analisado através do servidor Verify 3D e do ProSA-web (Wiederstein, 2007).

5.3 Construções dos vetores de expressão

A construção dos vetores foi realizada através do kit pCDNA 3.4 TOPO (Life Technology - Carlsbald, CA, USA) (Figura 1) que permite a clonagem rápida a partir de um produto de PCR contendo o gene de interesse ligado ao promotor HCMV (citomegalovírus humano), obtendo assim um vetor capaz de produzir altos níveis de proteína após a transfecção e cultivo em células de mamífero.

A enzima Taq polimerase possui uma atividade de transferência terminal, adicionando uma única desoxiadenosina (A) às extremidades 3' dos produtos de PCR. O vetor linearizado fornecido no kit apresenta resíduos 3' deoxitimidina (T) soltos, isso permite que os insertos de PCR se liguem ao vetor de forma eficiente. A topoisomerase I, por sua vez, se liga ao DNA dupla hélice em locais específicos e cliva uma das fitas após a região 5'-CCCTT (Shuman, 1991).

A energia gerada através da quebra da ligação fosfodiéster é conservada pela formação de uma ligação covalente entre o fosfato 3' da cadeia clivada e o resíduo de tirosina (Tyr-274) da topoisomerase I. A ligação fosfo-tirosil entre o DNA e a enzima pode ser posteriormente convertida pela hidroxila da fita quebrada, revertendo a reação e liberando a topoisomerase I (Shuman, 1994).

Foram utilizados os cDNAs das subunidades α e β , previamente obtidos através de PCR (Faria *et al.*, 2013; Sevilhano *et al.*, 2017) e purificados pelo método enzimático Exo-Sap-IT (Life Technology - Carlsbald, CA, USA). O cDNA purificado foi acrescido de sequência de Kozak (G/A) NNATGN através de um novo PCR utilizando primers específicos, desenhados de acordo com as recomendações do fabricante (Kozak, 1990).

Os cDNAs foram quantificado em NanoDrop™ 1000 (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, USA) adicionando 100 ng de produto de PCR purificado de cada subunidade de ag-FSH em seu respectivo vetor e originando assim os vetores de expressão pcDNA 3.4-TOPO ag-FSH α e 3.4-TOPO ag-FSH β .

Fig. 1: Mapa do vetor pcDNA TOPO 3.4: |PCMV| Promotor CMV 47-726 nt; Sítio de clonagem TOPO para ligação do primer sense 584-604NT; |WPRE| Woodchuck post-transcriptional regulatory element) 782NT; pCDNA 3.4 sítio de ligação do primer anti-sense 822-844nt; |TK pA| Sinal de poliadenilação TK 1388-1655nt; |PSV40| Early promoter 2124-2493nt; |Neomycin| Gene de resistência a neomicina 2529-3323nt; |SV40 pA| Sítio de poliadenilação 34400-3629nt; |pUC ori| sequência introduzida para aumento do número de cópias 4012-4685; |Ampicilin| gene de resistência a ampicilina 4830-5640.

5.4 Transformação das células competentes pelo método de choque térmico

A técnica de choque térmico apresenta uma metodologia simples, de baixo custo e de alta eficiência. Consiste no aumento repentino de temperatura criando uma diferença de pressão entre o exterior e o interior celular, induzindo assim a formação de poros na membrana plasmática bacteriana e permitindo que o plasmídeo entre na mesma (Cox *et al.*, 2012).

Seguindo as instruções do fabricante do kit pCDNA 3.4 TOPO (Life Technology - Carlsbad, CA, USA) foram adicionados 20 ng/2µL dos vetores pcDNA 3.4-TOPO ag-FSHα e 3.4-TOPO ag-FSHβ, obtidos anteriormente, em *vials* separados contendo 50µL de *E. coli* competente, com auxílio de uma pipeta estéril, homogeneizando suavemente de baixo para cima.

A reação foi incubada em gelo durante 30 minutos e transferida para o banho maria à 42° C durante 30 segundos, sem agitação. Após esse passo a reação foi transferida imediatamente para o gelo. O meio SOC, rico em glicose, foi adicionado à reação e colocado sob agitação horizontal de 200 rpm a 37 ° C por 1 hora. Cerca de 50 µL de cada transformação foi semeada, com auxílio de alça de Drigalski, em uma placa de LB com adição de ampicilina.

Após 16 horas de incubação em estufa à 37°C, foram observadas colônias bem definidas na placa semeada, confirmadas através de PCR e submetidas a sequenciamento. A eficiência de transformação fornecida pelo kit foi de 1×10^9 cfu /µg de plasmídeo.

5.5 Purificação de DNA plasmidial

As colônias selecionadas foram cultivadas em meio LB a 37°C em uma rotação de 150 rpm e purificadas através do kit de purificação de DNA Xtra Mini Nucleobond (Marchnerey-Nagel - Duren, Alemanha) para realização do sequenciamento plasmidial e DNA Xtra Midi Nucleobond (Macherey-Nagel - Duren, Alemanha) para a realização da transfecção em células HEK 293. Seguindo todas as informações do fabricante, obtivemos um plasmídeo limpo, estéril e isento de contaminação por fenol e cloreto de sódio. Esse passo é necessário para que não haja contaminação celular e interferência no complexo lipídico que levaria a uma baixa eficiência após a transfecção.

5.6 Sequenciamento de DNA plasmidial

O sequenciamento das subunidades α e β introduzidas em seus respectivos vetores TOPO foi realizado no Centro de Estudo de Genoma Humano (CEGH), localizado na Universidade de São Paulo (USP) em sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies Carlsbald, CA, USA) possibilitando uma rápida análise do DNA de 48 amostras (capilares), após a utilização do kit BigDye v3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems Carlsbald, CA, USA).

Esse passo foi importante para confirmar a sequência das subunidades e observar se a inserção do inserto no vetor aconteceu na orientação correta. As sequências foram analisadas pelo *software* Sequencing Analysis 5.3.1 e BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5 (Hall *et al.*, 1999)

5.7 Transfecção dos vetores de expressão TOPO em células HEK 293 F

A síntese do ag-FSH foi realizada utilizando o kit Expi293™ Expression System Kit (Life Technologies - Carlsbad, CA, USA). Cerca de 30 µg de DNA plasmidial (15µg para cada subunidade) foram dissolvidos em Opti-MEM® e posteriormente adicionados ao ExpiFectamine Reagent™, incubando por 20-30 minutos em temperatura ambiente, e obtendo assim 3 ml de complexo DNA-ExpiFectamina. Esse complexo foi adicionado até obter um volume de 28.5 ml de Expi293™ Expression Medium em frasco Erlenmayer de 125 ml contendo 7.5×10^7 células Expi293F™. O controle negativo foi preparado nas mesmas condições descritas anteriormente, porém adicionando 3 ml de Opti-MEM® no lugar do complexo DNA-ExpiFectamine.

Os frascos foram colocados em um *shaker* orbital a 125 rpm, em uma incubadora a 37°C e 8% de CO₂ onde acontece a reação de transfecção. Aproximadamente 16 horas após o início da transfecção foram adicionados o *Enhancer 1* e *Enhancer 2* provenientes do mesmo kit, atingindo assim um volume total de 30 ml por frasco. O meio contendo a suposta proteína recombinante de interesse foi coletado aproximadamente 48 horas após a adição dos *enhancers* e foi alíquotado e armazenado a -80°C para posterior análise em HPLC.

5.8 Purificação de ag-FSH através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC)

O primeiro passo da purificação foi realizado utilizando RP-HPLC modelo Shimadzu SCL-10AHPLC, acoplado a um detector SPD-10AV UV com uma coluna C4-Grace- Vydac C4 (300 Å de diâmetro dos poros, 5µm de tamanho das partículas e dimensão da coluna de 25 cm x 4.6 mm I.D) (Fisher Scientific, USA), acoplada com uma coluna de sílica LiChrosorb Si 60, 7,9–12,4 m (Merck, Darmstadt, Alemanha) localizada entre a bomba e o injetor. A temperatura da coluna foi mantida a 25° C. Foram utilizados dois tampões (A e B), sendo a solução A um tampão de fosfato de amônio (pH 8,6; 0,05 M) e a solução B composta por 50% de acetonitrila e 50% de tampão A. A eluição foi realizada com um gradiente de 25-100% de tampão B durante 40 minutos.

As condições de eluição e gradiente foram descritas em Loureiro e colaboradores (2006), e foram especificamente configuradas para não que não houvesse a dissociação do heterodímero, lembrando que no caso do FSH esta dissociação acontece com grande facilidade. O controle negativo da transfecção também foi aplicado utilizando a mesma estratégia cromatográfica.

Na RP-HPLC foram aplicados 5 mL de meio condicionado de ag-FSH e controle negativo, separadamente. Essas amostras foram previamente concentradas (6x) em membrana de celulose regenerada Amicon® Ultra Centrifugal Filters (Merck, HE, AL).

5.9 Purificação de ag-FSH através de cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular (HPSEC)

O *pool* coletado do RP-HPLC, após comparação com a mesma região obtida com controle negativo, foi previamente concentrado (5x) em membrana de celulose regenerada Amicon® Ultra Centrifugal Filters (Merck, HE, AL) e aplicado em uma coluna HPSEC G2000 SW (com o diâmetro dos poros de 125 Å, tamanho das partículas de 10µm e dimensões de coluna de 60 x 7.5 mm I.D) da Tosoh Bioscience (Tokyo, Japão), seguindo os protocolos descritos em nosso laboratório (Almeida et al., 2014). Em paralelo, uma corrida nas mesmas condições foi realizada com cerca de 5µg de padrão de FSH humano de origem hipofisária (NIDDK). O pico identificado próximo ao tempo de retenção do padrão humano foi coletado e repassado em HPSEC para ulterior purificação e quantificação do produto.

5.10 Dissociação do heterodímero

A preparação do ag-FSH obtida através da coleta do pico de interesse na HPSEC foi incubada a 37°C com ácido acético 5M por 16 horas (*overnight*) para dissociação e aplicação em RP-HPLC, seguindo as condições cromatográficas descritas em trabalho anterior (Carvalho *et al.*, 2009), especificamente estudadas para facilitar e manter a dissociação entre as duas subunidades α e β destes hormônios glicoproteicos.

6.2 Modelagem tridimensional e simulação dinâmica molecular relativa ao ag-FSH e ag-LH

Podemos observar na parte superior da Figura 3, a estrutura de ag-FSH e ag-LH evidenciando as duas subunidades, bem como, as pontes dissulfeto e as alças. O *seatbelt* (cinto de segurança) da subunidade β , conhecido por envolver a subunidade α , encontra-se entre a 3^a e a 12^a cisteína, C39 e C123, para a ag-FSH, e C47 e C131, para a ag-LH.

Essas informações coincidem com dados descritos na literatura, onde as “seat belts” estão alocados entre a 3^a e a 12^a cisteína da subunidade β e, dessa forma, fornecem a sustentação necessária à subunidade α .

Já na parte inferior da Figura 3, os modelos 3D são apresentados em estilo “*cartoon*”, destacando estruturas secundárias (hélices e folhas) e os dois resíduos de ag-LH (Ser-125 e Glu-87) localizados na região externa do Ramachandran plot, que será apresentado na Figura 7.

Fig. 3: Modelos tridimensionais obtidos após simulações de dinâmica molecular com base nas estruturas cristalinas de hFSH e hCGH. No topo, são mostradas as estruturas de ag-FSH e ag-LH da subunidade α (em verde) e da subunidade β (azul para FSH e magenta para LH) e as ligações dissulfídicas da subunidade β . Na parte inferior, os modelos 3D são apresentados em estilo cartoon e coloridos de acordo com a estrutura secundária (hélices em vermelho, folhas em amarelo e loops em verde), destacando os supostos “loops” das subunidades β e os dois resíduos (Glu-87 e Ser-125) indicados pelo Ramachandran plot.

Na parte superior da Figura 4 podemos observar as superfícies dos potenciais eletrostáticos de ag-FSH e ag-LH e as superfícies parciais das subunidades α e β . A referida simulação dinâmica serviu para confirmar a estabilidade dos modelos propostos e assim fixar a estrutura em 3D e a disposição espacial de cada folha β e α -hélice.

Já na parte inferior, observamos os 7 resíduos de prolina, totalmente ou parcialmente conservados quando comparados a modelos humanos e de *A. gigas*. Estão todos localizados nas regiões de inversão da “ β -sheet/loop” (folha/laço), confirmando a participação destes aminoácidos na mudança de direção do esqueleto (backbone) da proteína e contribuindo para o enovelamento da mesma.

Fig. 4: No topo podemos observar a superfície de potencial eletrostático nos modelos 3D de ag-FSH (esquerda) e ag-LH (direita) e superfície das subunidades α e β . A superfície foi colorida em azul (grupos carregados positivamente) e vermelho (grupos carregados negativamente), enquanto os grupos neutros estão em branco. A seta preta indica a estrutura do “cinto de segurança” das subunidades β . No fundo, podemos observar a localização das prolina conservadas: 5 para o ag-FSH e 7 para o ag-LH. Cada prolina é identificada de acordo com sua posição em relação ao resíduo de cisteína anterior.

Vários parâmetros estruturais, como o desvio da raiz quadrática média (RMSD) da posição do esqueleto (backbone) atômico indicando a estabilidade estrutural, o raio de rotação indicando a compactação da proteína, as áreas hidrofóbicas e hidrofílicas superficiais indicando a exposição ao solvente e o número de ligações de hidrogênio entre os átomos da proteína confirmaram que as estruturas de ambos os hormônios se estabilizaram em ~15 ns de simulação dinâmica molecular (Figura 5).

Fig. 5: Valores do desvio da raiz quadrada média (RMSD) das subunidades GTH α , FSH β e LH β nos respectivos heterodímeros (A); raio de giro (Rg) de todas as três subunidades nos complexos (B); superfície hidrofóbica e hidrofílica de dois hormônios simulados (C) e número total de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares de ambos os hormônios ao longo da simulação dinâmica molecular (D).

As flutuações da raiz quadrática média (RMSF) relativas ao carbono α das subunidades β de ambos os hormônios são mostradas na Figura 6. Como esperado, o RMSF da subunidade α sugere que seus esqueletos proteicos (*backbones*) têm perfis quase idênticos. No caso das subunidades β , pequenas diferenças nos valores de RMSF são observadas, sugerindo, porém, a existência de *backbones* semelhantes.

Fig. 6: Flutuação radicular média quadrática (RMSF) do carbono α das subunidades α (A) e subunidades β (B) dos dois hormônios estudados.

Na Figura 7, podemos observar ambos os modelos 3D validados com o ProSA-web, onde todos os resíduos foram encontrados sob pontuação 0. Utilizando o "Verify 3D", apenas o C-terminal de ag-LH β apresentou uma pontuação acima de 0. De acordo com o gráfico Ramachandran, o ag-LH apresentou, portanto, apenas 2 resíduos externos à região do loop (Figura 7).

Fig. 7: Resultados obtidos a partir da plotagem através do Prosa-web, Ramachandran e Verify 3D para ambos os hormônios.

Foi realizada uma comparação entre a composição dos aminoácidos localizados entre a 10^a e a 12^a cisteína do cinto de segurança do ag-LH, ag-FSH e de todas as gonadotrofinas analisadas por Aizen e colaboradores (2012). A região do cinto de segurança dos modelos ag-FSH β e ag-LH β apresentam características eletrostáticas similares que permitem que a subunidade α se ligue à subunidade β (Figura 8)

Fig. 8: Comparação entre a composição dos aminoácidos dos cintos de segurança de ag-LH e ag-FSH (do presente trabalho) e as gonadotrofinas estudadas por Aizen e colaboradores (2012). Cisteínas (rosa), carregados negativamente (vermelho), com carga positiva (azul), polar (ciano) e hidrofóbico (laranja).

Este trabalho de modelagem molecular permitiu identificar uma formação natural do “seat-belt”, perfeitamente conservado, diferentemente do outro modelo publicado de GTHs do peixe *C. maculata* (Chatterjee *et al.*, 2005). Isto levanta a importância descrita na literatura de determinados resíduos de aminoácidos e da distribuição e complementariedade da carga superficial relativa às duas subunidades, que

influenciam a seletividade e a especificidade da ligação hormônio-receptor para os GTHs de diferentes espécies.

6.3 Purificação de ag-FSH através de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) e cromatografia líquida de exclusão molecular de alta eficiência (HPSEC)

O ag-FSH e o controle negativo derivados da cultura das células HEK293 foram aplicados à coluna utilizando as mesmas condições de corrida descritas no item 3.7 de Materiais e Métodos. Um pico correspondente ao tempo de retenção (t_R) de 47.53 min foi escolhido por não estar presente no perfil cromatográfico do controle negativo. Podemos sugerir então, que esse material foi exclusivamente produzido pela adição dos vetores de expressão no estudo relacionados ao ag-FSH (Figura 9). O material correspondente a essa t_R foi coletado e utilizado no segundo passo de purificação.

Fig. 9: Primeiro passo de purificação do meio condicionado HEK293F através de RP-HPLC. O cromatograma é derivado da aplicação de 5 ml de meio condicionado de transfecção de ag-FSH, em comparação com um cromatograma análogo derivado da aplicação de 5 ml de controle negativo da transfecção.

O segundo passo de purificação foi realizado em coluna de exclusão molecular (HPSEC). O material coletado no primeiro passo de purificação foi concentrado em membrana de celulose (5x) e aplicado na coluna de HPSEC. O pico principal apresentou um tR de 14.13 minutos. Esse resultado se aproxima do pico obtido após a aplicação do padrão (FSH humano) que apresentou um tR de 14.78 minutos. Esses dados reforçam a existência de um ag-FSH com características cromatográficas parecidas com o padrão humano (Figura 10)

Fig. 10: Segundo passo de purificação de meio condicionado HEK293F através de HPSEC. (A) O cromatograma é derivado da aplicação de 0.4 ml do pico obtido durante a primeira purificação em RP-HPLC, (B) 5 μ g / 5 μ l de preparação de referência de FSH da hipófise humana do NHPP (National Hormone and Pituitary Program), executados em condições cromatográficas idênticas.

O material obtido através da segunda purificação foi coletado e 250 uL da amostra foi aplicada novamente em HPSEC para uma quantificação e análise qualitativa do material obtido. Na Figura 11, podemos observar um ag-FSH altamente purificado com aproximadamente 95% de pureza.

Fig. 11: Quantificação em HPSEC: (A) 0,25 ml de ag-FSH derivado de uma primeira purificação em RP-HPLC e uma segunda purificação em HPSEC; (B) 5µg / 5µl de preparação de referência de FSH da hipófise humana do NHPP, executados em condições idênticas.

O restante do material proveniente da segunda purificação (1.75 mL) foi liofilizado e parte dele foi ressuspendido em tampão fosfato e aplicado uma terceira vez em HPSEC para análise da integridade do material liofilizado. Na Figura 12 podemos observar um produto estável e íntegro mesmo após o processo de liofilização.

Fig. 12: Análise da pureza e integridade do material liofilizado em HPSEC

Ao longo desse trabalho, cerca de 9 transfecções em HEK293 transientes foram realizadas e analisadas nas mesmas condições cromatográficas. O produto obtido após a liofilização indicou um rendimento médio de ~ 28 mg/litro de ag-FSH puro e íntegro.

6.4 Confirmação da identidade do ag-FSH através da dissociação do heterodímero em ácido acético

Na figura 13, podemos observar a dissociação do heterodímero mediante ácido acético 5M durante o período de 16 horas, resultando em um cromatograma com dois picos principais, provavelmente, referentes as subunidades α e β do ag-FSH.

De acordo com Carvalho e colaboradores (2009), em que o nosso grupo de pesquisa descreveu pela primeira vez a dissociação de hormônios heterodiméricos glicoproteicos humanos, o perfil cromatográfico dissociado de hFSH foi o único que apresentou a subunidade β como menos hidrofóbica que a α . Considerando esses resultados, acredita-se que o ag-FSH apresentaria o mesmo perfil após a dissociação heterodimérica, portanto, o pico referente ao t_R de 27.6 minutos estaria de acordo com a subunidade β de pirarucu, enquanto o t_R de 33.0 minutos com a subunidade α .

A soma dos picos correspondentes às subunidades α e β foi maior que 95% da quantidade de material não dissociado, o que mostra que a reação de dissociação não causou nenhuma perda significativa em virtude de degradação ou agregação. Este tipo de caracterização confirmou, portanto, a identidade do ag-FSH.

Fig. 13: RP-HPLC realizada sob condições de dissociação, após aplicação de uma amostra de ag-FSH obtida em HPSEC e incubada com ácido acético 5 M a 37 ° C.

7. DISCUSSÃO

Segundo trabalhos encontrados na literatura, os peptídeos maduros das subunidades β de FSH e LH são derivados do mesmo gene ancestral (Kawauchi *et al.*, 2006; Li *et al.*, 1998). A comparação entre as sequências de aminoácidos do ag-FSH β e ag-LH β revela uma identidade de 49,5%, superior ao calculado para outros peixes, que varia de 32 a 40% (Yoshiura *et al.*, 1997; Degani *et al.*, 2003; So *et al.*, 2005), além das 12 cisteínas conservadas e do primeiro sítio de N-glicosilação (NxT).

Outros dados interessantes encontrados sobre as regiões conservadas desses hormônios de peixes, estão relacionados ao segundo sítio de N-glicosilação (ausente em ambas as subunidades β das GTHs do *A. gigas*), bem como a posição altamente conservada entre cisteína 7 e a cisteína 8 e as posições de interface do dímero, semelhante ao que foi relatado para outras cadeias β de hormônios glicoproteicos (Lapthorn *et al.*, 1995; Fan *et al.*, 2005).

Na posição relacionada com o segundo sítio putativo de N-glicosilação, as formas humanas, por exemplo, apresentam um sítio NTT ativo, enquanto o ag-FSH β e ag-LH β apresentam sequências inativas TTT e QTT, respectivamente. A região conservada entre a cisteína 7 e 8 (relacionadas aos tetrápodes) não parecem estar relacionadas a nenhuma função conhecida. Curiosamente, esta região também é rica em resíduos de prolina, que podem ser essenciais para a estrutura da subunidade β , uma vez que as prolinas tendem a ser responsáveis pela região de dobramento dos aminoácidos e, conseqüentemente, com a mudança de direção do esqueleto da mesma (Baldwin *et al.*, 2008; Morgan *et al.*, 2013).

A principal característica da estrutura primária das subunidades β de FSH e LH é a presença de 12 cisteínas conservadas. Essas cisteínas são importantes para determinar uma estrutura semelhante a um nó, compreendendo 3 pontes dissulfeto (Boime *et al.*, 1999) para estabilização do heterodímero (Xing *et al.*, 2004) e conseqüentemente para atividade biológica desse hormônio (Campbell *et al.*, 1991; Grossmann *et al.*, 1997).

O alinhamento dos peptídeos maduros de LH e FSH de diversos peixes mostra que a estrutura é altamente conservada no LH β , mas não no FSH β (Levavi-Sivan *et al.*, 2010). A tabela da porcentagem de identidade dos aminoácidos mostra que o FSH β é mais variável do que o LH β (27,8-66,6% e 46,6-89,5%, respectivamente), contrastando com a superclasse dos Tetrapoda, onde o LH β divergiu mais rapidamente do que o FSH β .

Segundo So e colaboradores (2005), a conservação significativamente menor do FSH β em peixes implica uma divergência funcional desse hormônio e levanta uma questão interessante sobre os papéis e a relevância fisiológica do FSH em diferentes grupos de teleósteos. Além disso, o ag-GTH α (Faria *et al.*, 2013), ag-FSH β e ag-LH β mostram 67%, 45% e 51% de identidade com os mesmos hormônios humanos, respectivamente e 66%, 67% e 63% com aqueles de rato. Estes valores de identidade, são da mesma ordem que os existentes entre as sequências humanas e de ratos (72%, 65% e 63%) e possibilitaria uma futura detecção de bioatividade *in vivo* para o nosso ag-FSH recombinante em um ensaio clássico de ratos utilizado para a determinação da potência biológica do hormônio gonadotrófico humano, em que a preparação de referência é o FSH recombinante humano da OMS (Steelman *et al.*, 1953; Storrington *et al.*, 2001). Porém essa é apenas uma hipótese que poderá ser verificada experimentalmente com o nosso hormônio recombinante purificado.

Em nosso alinhamento de FSH β com outras 40 espécies de peixes (Figura 2), apenas 14 posições são totalmente idênticas, sendo 9 delas cisteínas. Duas das três cisteínas conservadas restantes (a 10^a e a 11^a) podem ser encontradas, no entanto, em 40 das sequências de peixes aqui analisadas, exceto em *Danio rerio*. A última cisteína não conservada (3^a) é equivalente à terceira cisteína tetrápode e, de acordo com vários autores, está presente em peixes antigos como elasmobrânquios (Querat *et al.*, 2001), condrosteanos (Querat *et al.*, 2000), enguias (Aizen *et al.*, 2012) e Ostariophysi (Siluriformes e Cypriniformes), mas não em Salmoniformes e Acanthomorpha (Acanthopterygii e Paracanthopterygii). O alinhamento atual confirma esses dados, pois o *A. gigas*, um peixe antigo, também apresenta a 3^a cisteína como nos tetrápodes.

Quando as sequências do peptídeo de FSH β e LH β de *A. gigas* são comparadas com as de outros peixes, as menores identidades foram encontradas com os Acanthomorpha (principalmente Gadiformes) e as maiores identidades com os teleósteos basais: Anguilliformes e Ostariophysi (Cypriniformes e Siluriformes). Embora em um nível mais alto de conservação, o mesmo padrão foi encontrado por Faria e colaboradores (2013), comparando o peptídeo ag-GTH α com outras ordens de peixes, variando de 55 a 70% para Acanthomorpha e 88,1 a 89,5% para Anguilliformes e Ostariophysi. Além disso, as comparações de ag-GTH α com Acipenseriformes (Chondrostei) e Salmoniformes também mostraram altos valores de identidade (87,1% e 75,7%, respectivamente).

Assim como em outros hormônios gonadotróficos, a formação de um cinto de segurança na estrutura da subunidade β que envolve a subunidade α , favorecida pela ligação dissulfeto existente entre uma terminação N (C3) e uma C-terminal (C12) (Boime *et al.*, 1999; Lapthorn *et al.*, 1994; Chauhan *et al.*, 2013) também é observado em modelos 3D de *A. gigas*.

Entretanto, Chatterjee e colaboradores (2005), observaram que a 3^a cisteína conservada está ausente na espécie *Channa maculata* e, com base em sua modelagem, sugeriu que, graças à flexibilidade da alça C-terminal, uma ligação dissulfeto poderia ser formada entre uma cisteína N-terminal deslocada e a 12^a.

Já nos nossos dados, observou-se que a complementaridade eletrostática das subunidades α e β nos modelos 3D de ag-FSH e ag-LH favorecem perfeitamente a formação do cinto de segurança. Os resíduos incluídos na região de cinto de segurança (entre C10 e C12) também demonstraram estar envolvidos na ligação seletiva e na

determinação da especificidade do receptor. A diferença de carga líquida entre o 10º e o 11º resíduo de cisteína da subunidade β de gonadotrofina humana parece, de fato, ter selecionado a ativação do receptor de FSH da ativação do receptor de LH (Levavi-Sivan *et al.*, 2010).

Enquanto vários estudos realizaram modelagem molecular para humanos e para outros GTHs de mamíferos, até onde sabemos existem apenas três trabalhos que relataram tais modelos para espécies de peixes (Chatterjee *et al.*, 2005; Aizen *et al.*, 2012; Aizen *et al.*, 2014).

Em um estudo realizado por Aizen e colaboradores (2012) foram analisadas farmacologicamente e estruturalmente (modelagem 3D) as interações entre GTHs e GTHRs de peixes como a enguia, truta e tilápia. Os autores identificaram a importância, na ativação do receptor, de alguns resíduos localizados fora da região de ligação hormônio-receptor, determinando diversas características eletrostáticas e estéricas nas diferentes espécies.

No presente trabalho, houve uma diferença entre a distribuição de carga na região superior da subunidade β de ag-FSH (carregada negativamente) e β de ag-LH (carregada positivamente), enquanto a subunidade α dos hormônios é predominantemente positiva.

A região dos cintos de segurança dos modelos ag-FSH β e ag-LH β apresenta características eletrostáticas similares que permitem que a subunidade α se ligue à subunidade β . Combarous (1992), afirmou que a subunidade α comum poderia ser responsável pela ligação de alta afinidade ao receptor, enquanto no caso da subunidade β , sua especificidade de ligação ao receptor seria determinada através da inibição de sítios que assim impediriam a ligação de cada dímero aos receptores dos outros hormônios. Nos nossos modelos, de fato, a superfície superior de cada superfície β tem diferentes distribuições eletrostáticas. Seria necessário, construir modelos estruturais hormônio- receptor para os diversos ag-GTHs, a fim de avaliar se a carga eletrostática do heterodímero poderia influenciar ligações cruzadas hormônio específicas. Aizen e colaboradores (2012) mostraram uma reação cruzada ativa entre o LH de enguia (eel-LH) e de truta (tr-LH), que poderia ser explicada pela alta similaridade das sequências de cinto de segurança entre o LH de enguia e o tr-LH (14 idênticas e 3 semelhantes, em um total de 18 resíduos).

Como se pode observar, adicionando as sequências de ag-GTH ao alinhamento realizado por esses mesmos autores (Figura 7), uma similaridade ainda maior é

encontrada entre o ag-LH e a eel-LH (15 resíduos idênticos e 1 resíduo similar), ou entre ag- LH e ta-LH (15 idênticos e 3 similares), até a incrível “quase-identidade” encontrada entre ag-LH e tr-LH: 17 idênticas e uma similar, de um total de 18 resíduos. Portanto, seria de se esperar uma ativação farmacológica significativa do receptor eel-LHR, tr-LHR ou de tilapia (ta-LHR) por ag-LH. Até onde sabemos, as sequências do ag-GTHR, que poderiam fornecer modelos estruturais adicionais do conjunto hormônio-receptor, possivelmente prevendo outras ativações cruzadas, ainda não estão disponíveis.

Finalmente, ainda comparando os modelos 3D de ag-LH e ag-FSH com os modelos de FSH humano construídos por Aizen e colaboradores (2012), vale ressaltar que o enovelamento calculado para os modelos de gonadotrofina de *A. gigas* está muito próximo do enovelamento relatado para o humano, bovino, porcino e peixe. Esses dados apontam para a estabilidade dos nossos modelos propostos e indicam que os enovelamentos calculados confirmam os dados experimentais e da literatura (Lindahl *et al.*, 2001; Lovell *et al.*, 2002; Aizen *et al.*, 2012).

Uma síntese preliminar de ag-FSH foi realizada em uma cultura específica em suspensão da linhagem celular HEK293, a fim verificar se os transcritos por nós clonados poderiam expressar o nosso hormônio recombinante. Testes cromatográficos de identidade também foram realizados, não deixando dúvidas de que estávamos na presença do ag-FSH heterodimérico. Devemos enfatizar que nenhum imunensaio específico, anticorpo ou padrão de referência é atualmente disponível para essa espécie, o que tornou nossa tarefa bastante difícil. Graças a estes resultados, será possível otimizar a síntese e completa caracterização do ag-LH e possivelmente de outros hormônios desta espécie de peixe.

8. CONCLUSÃO

Os modelos tridimensionais de ag-FSH e ag-LH gerados com base nas estruturas cristalinas de h-FSH e h-CG, sugeriram a presença do cinto de segurança (*seatbelt*), favorecido por uma ligação dissulfureto formada entre a 3^a e a 12^a cisteína. Através desse estudo de modelagem foi possível caracterizar tridimensionalmente e elucidar dúvidas referentes a estrutura proteica do ag-FSH, possibilitando assim, um melhor entendimento de sua função e de aplicações futuras.

A metodologia aplicada utilizando células em suspensão HEK293 foi promissora, obtendo níveis satisfatórios de expressão (~28 mg/litro) e fornecendo maior rapidez, praticidade e otimização em relação a proteína em estudo quando comparadas com a técnica de transfecção permanente em CHO utilizada anteriormente pelo grupo.

Ambos os métodos cromatográficos utilizados nesse trabalho permitiram uma caracterização inicial do ag-FSH e sua purificação. Adicionalmente, com a técnica de dissociação do heterodímero, podemos afirmar com certeza que o produto purificado obtido foi perfeitamente identificado graças ao seu comportamento cromatográfico semelhante ao do hFSH.

A possibilidade de equivalência entre o método físico-químico utilizado e um ensaio *in vivo*, ainda gera opiniões divergentes quanto à possibilidade de correlacionar um parâmetro derivado de uma função fisiológica global com uma determinação físico-química mais específica da proteína a ser estudada. Acreditamos que uma caracterização completa de uma glicoproteína deveria englobar tanto técnicas físico-químicas quanto ensaios biológicos “*in vivo*”.

9. REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, B.E.; OLIVEIRA, J.E.; CARVALHO, C.M.; DALMORA, S.J.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Analysis of human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin preparations of different origins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J Pharmaceut. Biomed**, 53: 90-97, 2010.
2. ALMEIDA, B.E.; OLIVEIRA, J.E.; DAMIANI, R.; DALMORA, S.L.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. A pilot study on potency determination of different preparations of hFSH: a comparison between RP-HPLC and the classical Steelman-Pohley in vivo bioassay. **J Pharm Biomed**, 54: 681-686, 2011.
3. ALMEIDA, B.E.; OLIVEIRA, J.E.; DAMIANI, R.; DALMORA, S.L.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein hormones in the presence of a large excess of human serum albumin. **J Pharm Biomed**, 63: 160-164, 2012.
4. ALMEIDA, B.E.; DAMIANI, R.; OLIVEIRA, J.E.; DALMORA, S.L.; TORJESSEN, P.A.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Reversed-phase high performance liquid chromatography as an alternative to animal bioassay for human thyrotropin potency determination. **Anal Methods**, 6: 6688-6694, 2014
5. AIZEN, J.; KOWALSMAN, N.; KOBAYASHI, M.; HOLLANDER, L.; CHANG SOHN, Y.; YOSHIZAKI, G.; NIV, MY.; LEVAVI-SIVAN, B. Experimental and computational study of inter- and intra- species specificity of gonadotropins for various gonadotropin receptors. **Mol Cell Endocrinol**, 364: 89–100, 2012.
6. AIZEN, J.; KOWALSMAN, N.; NIV, M.Y.; LEVAVI-SIVAN, B. Characterization of tilapia (*Oreochromis niloticus*) gonadotropins by modeling and immunoneutralization. **Gen Comp Endocrinol**, 207: 28–33, 2014
7. BALDWIN, R.L. The search for folding intermediates and the mechanism of protein folding. **Annu Rev Biophys**, 2008
8. BAYLEY, P.B.; PETRERE M. Amazon fisheries: assessment methods, current status and management options. **Can Spec Publ Fish Aquat Sci**, 106:385–398, 1989

9. BERENDSEN, H.J.C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Comp Phys Commun**, 91: 43-56, 1995.
10. BOIME, I.; BEN-MENACHEM, D. Glycoprotein hormone structure-function and analog design. **Recent Prog Horm Res**, 54: 271–287, 1999.
11. BRAZIL. 2004. List of overexploited or threatened with over exploitation aquatic invertebrates and fishes. In **Official Diary**, Federal Republic of Brazil, 28 May 2004, pp. 136–142. Ministry of Environment, Brazil, Brasília
12. CARVALHO, C.M.; OLIVEIRA, J.E.; ALMEIDA, B.E.; UEDA, E.K.M.; TORJENSEN, P.A.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Efficient isolation of subunits of recombinant and pituitary glycoprotein hormones. **J Cromatog**, 1216: 1431-1438, 2009.
13. CHATTERJEE, A.; SHEEN, S.T; YU, J.Y.L. Molecular cloning of cDNAs and structural model analysis of two gonadotropin β -subunits of snakehead fish (*Channa Maculata*). **Gen Comp Endocrinol**, 143: 278-286, 2005
14. CHAUHAN, J.S.; RAO, A.; RAGHAVA, G.P.S. In silico platform for prediction of N-, O- and C-glycosites in eukaryotic protein sequences, **Plos One**, 8: e67008, 2013.
15. COMBARNOUS, Y. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. **Endocr Rev**, 13: 670–691, 1992.
16. COX, M.; DOUDNA, J.; O'DONNELL, M. Biologia Molecular: Princípios e Técnicas. **Artmed**, 944, 2012
17. DEGANI, G.; GOLDBERG, D.; TZCHORI, I.; HURVITZ, A.; DIN, S.Y.; JACKSON K. Cloning of European eel (*Anguilla anguilla*) FSH- β subunit, and expression of FSH- β and LH- β in males and females after sex determination. **Comp Biochem Physiol. B**. 136: 283–293, 2003.
18. FAN, Q.R.; HENDRICKSON, W.A. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. **Nature**. 433: 269–277, 2005
19. FARIA, M.T.; CARVALHO, R.F.; SEVILHANO, T.C.A.; OLIVEIRA, N.A.J.; SILVA, C.F.P.; OLIVEIRA, J.E.; SOARES, C.R.J.; GARCEZ, R.; SANTO, P.R.E.;

- BARTOLINI, P. Isolation of the pituitary gonadotrophic α -subunit hormone of the giant amazonian fish: pirarucu (*Arapaima gigas*). **Fish Physiol Biochem**, 39: 683-693, 2013.
20. FONTAINE, M. Physiological mechanisms in the migration of marine and amphihaline fish. **Adv. Mar. Biol**, 13:241-235, 1975
 21. GODINHO H.P.; SANTOS J.E.; FORMAGIO P.S.; GUIMARÃES-CRUZ R.J. Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). **Acta Zool**, 864:289–294, 2005.
 22. GOULDING, M. 1980 The Fishes and the Forest: explorations in Amazonian natural history. pp.280. Berkeley, University of California.
 23. GUDGER, E. W. The giant fresh-water fishes of South America. **Science Monthly**, 57: 500–513, 1943
 24. HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucl. Acids.Symp.Ser**, 41:95-98, 1999
 25. HRBEK, T.; FARIAS, I.P.; CROSSA, M.; SAMPAIO, I. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. **Anim Conserv**, 83:297–308, 2005
 26. HURVITZ, A.; DEGANI, G.; GOLDBERG, D.; DIN, S.Y.; JACKSON, K.; LEVAVI-SIVAN, B. Cloning of FSH β , LH β and glycoprotein α from the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*), β -subunit mRNA expression, gonad development, and steroid levels in immature fish. **Gen Comp. Endocrinol**, 140:61-73, 2005
 27. KAWAUCHI, H; SOWER, S.A. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. **Gen Comp Endocrinol**. 148: 3–14., 2006
 28. KOZAK, M. Downstream Secondary Structure Facilitates Recognition of Initiator Codons by Eukaryotic Ribosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 87: 8301-8305, 1990.
 29. LAPTHORN, A.J.; HARRIS, D.C.; LITTLEJOHN, A.; LUSTBADER, J.W.; Canfield, R.; Machin KJ. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. **Nature**. 369-455–461, 1994.

30. LEVAVI-SIVAN, B.; BOGERD, J.; MAÑANÓS, E.L.; GÓMEZ, A.; LAREYRE, J.J. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. **Gen Comp Endocrinol.** 165: 412–437, 2010.
31. LI, M.D.; FORD, J.J. A comprehensive evolutionary analysis based on nucleotide and amino acid sequences of the α - and β -subunits of glycoprotein hormone gene family. **J Endocrinol.** 156: 529:542, 1998.
32. LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, B. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **J Mol Mod**, 7: 306–317, 2001.
33. LOUREIRO, R.F.; OLIVEIRA, J.E.; BARTOLINI, P.; RIBELA, M.T.C.P. Analysis of intact hFSH preparations by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr A**, 1136: 10-18, 2006.
34. LOVELL, S.C.; DAVIS, I.W.; ADRENDALL, W.B.; BAKKER, P.I.W.; WORD, J.M.; PRISANT, M.G. Structure validation by Calpha geometry: Phi, psi and Cbeta deviation. **Proteins**, 50: 437-450, 2002.
35. MARTI-RENOM, M.A.; STUART, A.; FISER, A.; SÁNCHEZ, R.; MELO, F.; SALI, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, 29: 291-325, 2000.
36. MENDONÇA, F, OLIVEIRA, J.E, BARTOLINI P, RIBELA, M.T.C.P. Two-step chromatographic purification of recombinant human thyrotropin and its immunological, biological, physico-chemical and mass spectral characterization. **J Chromatogr A**, 1062: 103-112, 2005.
37. MORGAN, A.A.; RUBENSTEIN, E. Proline: the distribution, frequency, positioning, and common functional roles of proline and polyproline sequences in the human proteome. **PLoS ONE**, 2013.
38. MYLONAS, C.C., FOSTIER, A., ZANUY S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **Gen Comp Endocrinol**, 165:516-534, 2010.
39. QUERAT, B.; SELLOUK, A.; SALMON, C. Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*)

- β -subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone. **Biol Reprod**, 63: 222–228, 2000.
40. QUERAT, C.; TONNERRE-DONCARLI.; F., GENIES.; C. Salmon duality of gonadotropins in gnathostomes. **Gen. Comp. Endocrinol**, 124:308-314, 2001.
 41. SCHMITZ, M.; AROUA, S.; VIDAL, B.; LE BELLE, N.; ELIE, P.; DUFOUR, S. Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian development and under sexual steroid feedback in the European eel. **Neuroendocrinol.**, 81: 107-119, 2005.
 42. SO, W.K.; KWOK, H.F.; GE, W. Zebrafish gonadotropins and their receptors: II. cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits—their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity. **Biol Reprod**. 72, 1382–1396, 2005.
 43. SODING, J.; BIEGERT, A.; LUPAS, A.N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic Acids Res**, 33: 244-248, 2005.
 44. SHUMAN, S. Recombination Mediated by Vaccinia Virus DNA Topoisomerase I in Escherichia coli is sequence specific. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 88: 10104-10108, 1991.
 45. SCHUMAN, S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccina DNA topoisomerase. **J. Biol. Chem**, 269: 32678-32684, 1994
 46. SEVILHANO, T.C.A.; CARVALHO R.F.; OLIVEIRA N.A.J.; OLIVEIRA, J.E.; MALTAROLLO V.G.; TROSSINI G.; GARCEZ, R.; BARTOLINI, P. Molecular cloning and characterization of pirarucu (*Arapaima gigas*) follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone β -subunit cDNAs. **PLoS ONE**, 12:8, 2017.
 47. TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 5: molecular evolutionaty genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol**, 28:2731-2739, 2011.
 48. WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M.J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in threedimensional structures of proteins. **Nuc. Acids Res**, 35: W407-W410, 2007.

49. YOSHIURA, Y.; KOBAYASHI, M.; KATO, Y.; AIDA, K. Molecular cloning of the cDNAs encoding two gonadotropin β -subunits (GTH-I β and -II β) from the goldfish, *Carassius auratus*. ***Gen Comp Endocrinol***. 105: 379–389, 1997.