Marina Katia Ferreira Mazzoni

Clonagem e expressão de proteína antiapoptótica presente na hemolinfa de *Lonomia obliqua* Walker 1855 (Lepidoptera: Saturniidae) em *Escherichia coli*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2015

Marina Katia Ferreira Mazzoni

Clonagem e expressão de proteína antiapoptótica presente na hemolinfa de *Lonomia obliqua* Walker 1855 (Lepidoptera: Saturniidae) em *Escherichia coli*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Mazzoni, Marina Katia Ferreira.

Clonagem e expressão de proteína antiapoptótica presente na hemolinfa de *Lonomia obliqua* Walker 1855 (*Lepidoptera: Saturniidae*) em *Escherichia coli* / Marina Katia Ferreira Mazzoni. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Clonagem e expressão de proteína recombinante, biologia molecular.

Versão do título para o inglês: Cloning and expression of antiapoptotic protein present in the hemolymph of *Lonomia obliqua* Walker 1855 (*Lepidoptera: Saturniidae*) in *Escherichia coli*.

1. Clonagem 2. Expressão gênica 3. Proteína recombinante 4. Antiapoptótica 5. *Escherichia coli* 6. *Lonomia obliqua* I. Mendonça, Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0126/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato (a): Marina Katia Ferreira Mazzoni.

Título da Dissertação: Clonagem e expressão de proteína antiapoptótica presente na hemolinfa de *Lonomia obliqua* Walker 1855 (Lepidoptera: Saturniidae) em *Escherichia coli*.

Orientador (a): Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 13 de setembro de 2012.

Protocolo: I-961/12

Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça
Laboratório de Parasitologia
Instituto Butantan

Referente Projeto: "Clonagem e expressão da proteína antiapoptótica presente na hemolinfa de *Lonomia obliqua* por tecnologia de DNA recombinante em *Escherichia coli*".

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) informa que o projeto acima referido é isento de análise por parte desta Comissão, pois não faz uso de animais vertebrados em sua execução.

Cordialmente,

Dr. Marcelo Larami Santoro
Coordenador da CEUAIB

Dedico este trabalho...

Aos meus pais Werter Mazzoni e Maria José, por toda a compreensão, pelo amor incondicional e por serem meus exemplos de caráter e dignidade. Tudo o que sou hoje, devo somente a vocês, por tudo o que me ensinaram e continuam me ensinando. Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo da minha vida, e não somente como aluna, mas que em todos os momentos foi o responsável pela minha saúde e força para superar todas as dificuldades e me permitir concluir mais um grande trabalho em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça, pela oportunidade oferecida, e por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, pela atenção, confiança e apoio.

Ao Dr. Fernando Luiz Kamitani, que como meu co-orientador de maneira informal, esteve sempre presente, me ensinando que no “mundo da pesquisa”, os erros também são resultados. Obrigada pela insistência e paciência, você foi um grande amparo em muitas vezes que me senti desestimulada com os resultados “negativos” obtidos neste trabalho.

Aos meus pais Werter Mazzoni e Maria José pelo incentivo nas horas difíceis de desânimo e cansaço, apoio incondicional e também pela paciência, por todas as vezes que eu quis apresentar meu trabalho para treinar, mesmo sendo um assunto totalmente fora da área de conhecimento de cada um, sempre estiveram dispostos a me ouvir.

Aos meus irmãos Francisco e Fabiana que sempre me ensinam mais e mais com suas experiências de vida e também às minhas sobrinhas, Bianca e Luisa, crianças lindas que me mostram até hoje, mesmo com tão poucos anos de vida, que tudo é mais facilmente resolvido com um sorriso no rosto.

Ao meu namorado Celso, e meu grande amor, pelo companheirismo, apoio, e por me ensinar que a cada dia podemos recomeçar e sermos melhores que ontem, em todos os aspectos.

A minha psicóloga, Renata Leite, minha “confidente”, pelo incentivo de todo dia, por me ajudar a perceber e entender que não podemos desistir de nossos sonhos, e que tudo nessa vida é válido quando realizado com vontade.

Aos colegas do laboratório: Karina, Juliana, Natalia, Guilherme, Henrique, Simone, Lurdinha, Arlete e Isabel por todas as colaborações, em especial, à amiga Taisy Mazur, pela compreensão, amizade e companheirismo...que essa nossa amizade permaneça.

Ao meu amigo de faculdade, Rafael, que mesmo morando bem longe neste momento, ainda se mantém presente e muito atencioso com meus planos, obrigada!

A minha amiga de colégio, Thatianne Cantharino, primeiramente pela amizade verdadeira de tantos anos e pelo interesse em me ajudar quando me apresentou a uma conhecida do Instituto Butantan, a pesquisadora Solange Lima Netto, muito querida e atenciosa, que me orientou em procurar meu atual orientador Ronaldo Zucatelli Mendonça, que mais uma vez, agradeço pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado!

“We cannot solve our problems with the same thinking we used when we created them.”

Albert Einstein

RESUMO

MAZZONI, M. K. F. **Clonagem e expressão de proteína antiapoptótica presente na hemolinfa de *Lonomia obliqua* Walker 1855 (Lepidoptera: Saturniidae) em *Escherichia coli***. 2015. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A classe *Insecta* desperta interesse para pesquisas, pois são animais muito numerosos na Biosfera e altamente adaptáveis a qualquer ambiente. A lagarta *Lonomia obliqua* destaca-se por apresentar em sua hemolinfa proteínas com atividade biológica demonstrada em cultivos celulares, como a antiapoptótica. A literatura disponível não apresenta trabalhos sobre a expressão de proteína antiapoptótica de *L. obliqua*. Então este estudo objetiva a expressão heteróloga da proteína antiapoptótica, presente na hemolinfa de *L. obliqua*, no sistema bacteriano *Escherichia coli*. Para a expressão heteróloga, o fragmento foi subclonado em vetor pET28a e transformadas bactérias *E. coli* linhagem BL 21 Star. A indução da expressão da proteína recombinante foi atingida com a adição de IPTG 1 mM. A banda correspondente ao tamanho da proteína recombinante foi visualizada em géis de poliacrilamida e por western blot utilizando anticorpo anti-His. Verificou-se que a APLOrEC estava em corpúsculos de inclusão que foram posteriormente solubilizados utilizando um tampão com 4M de uréia. A cultura induzida foi lisada e a APLOrEC foi purificada por afinidade pela cauda de histidina por *beads* magnéticas (IMAC) e o excesso de uréia eliminado por diálise. O efeito protetor da APLOrEC purificada foi analisado comparativamente á hemolinfa bruta (proteína nativa) 2,5% (v / v) em células VERO e L929 frente à indução de morte celular por H₂O₂, mostrando que 0,5 µg / ml da APLOrEC foi capaz de proteger as células após serem desafiadas com 4 mM de H₂O₂. A alteração do citoesqueleto das células utilizadas foi determinada por microscopia confocal e mostrou que o efeito protetor de APLOrEC se estende ao citoesqueleto celular, mantendo a rede de actina e portanto, mantendo as células viáveis.

Palavras-chave: Clonagem. Expressão gênica. Proteína recombinante. Antiapoptótica. *Escherichia coli*. *Lonomia obliqua*.

ABSTRACT

MAZZONI, M. K. F. **Cloning and expression of antiapoptotic protein present in the hemolymph of *Lonomia obliqua* Walker 1855 (Lepidoptera: Saturniidae) in *Escherichia coli*.** 2015. 83 p. Master thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The Class Insecta is an interesting target for further research, mainly because it is in high numbers through the Biosphere and adaptability to virtually any environment. The *Lonomia obliqua* caterpillar stands out for its hemolymph proteins with biological activity already demonstrated in cell cultures, such as an anti-apoptotic activity. The available literature has no record of previous work on heterologous expression of *L. obliqua* anti-apoptotic protein. So this study aims to achieve heterologous expression of an anti-apoptotic protein, present in the hemolymph of *L. obliqua*, on the bacterial host *Escherichia coli*. For heterologous expression, the fragment was subcloned into pET28a vector and bacteria *E. coli* strain BL 21 Star was transformed. Induction of protein expression was achieved adding 1 IPTG mM. The band corresponding to the size of the recombinant protein was visualized in polyacrylamide gels and by western blot using anti-His antibody. We found that the APLOrEC was included into inclusion bodies, that were subsequently solubilized using a buffer with 4M urea. The bacterial culture was lysed and APLOrEC was purified by affinity of magnetic beads for proteic histidine tails (IMAC) and excess urea removed by dialysis. The protective effect of purified APLOrEC was analyzed and compared to crude hemolymph (native protein) 2.5% (v / v) in Vero cells and L929 against cell death induction by H₂O₂, showing that 0.5 µg / ml of APLOrEC was capable of protect cells after being challenged with 4 mM H₂O₂. Cytoskeleton alterations on cells were observed by confocal microscopy and showed that the protective effect of APLOrEC is extended to cytoskeleton actin, maintaining the network and therefore maintaining the viability of the cells.

Keywords: Cloning. Gene expression. Recombinant protein. Antiapoptotic. *Escherichia coli*. *Lonomia obliqua*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo completo da metamorfose de <i>L. obliqua</i>	21
Figura 2 - Hábito gregário das lagartas <i>L. obliqua</i>	22
Figura 3 - Processo evolutivo da morte celular por apoptose em célula VERO	26
Figura 4 - Diferenças entre morte celular por apoptose e por necrose.....	29
Figura 5 - Cronograma do experimento	36
Figura 6 - Mapa do vetor pCR™ II-TOPO®	38
Figura 7 - Mapa do vetor pET28a	39
Figura 8 (A/B) – Dados para a obtenção da sequência codificadora para a proteína antiapoptótica	40
Figura 9 - Equação do cálculo de razão molar entre inserto e vetor	44
Figura 10 - Esquema da microplaca de 96 poços contendo células VERO mostrando o teste de atividade biológica da APLOrEC e da HB, desafiadas com indutores químicos de apoptose (T-BHP e H ₂ O ₂).	54
Figura 11 - Sequência teórica da APLOrEC/ pET28a.....	56
Figura 12 - Gel de agarose 1,5% mostrando a amplificação do fragmento de interesse obtido por PCR a partir do cDNA.	57
Figura 13 - Gel de agarose 1,5% para visualização da PCR de triagem dos clones dos transformantes em <i>E. coli</i> BL 21 (DE3) pLysS.....	59
Figura 14 - Resultado do sequenciamento dos três clones positivos de APLOrEC/ pET28a e a provável tradução da proteína expressa.....	60
Figura 15 - Gel de poliacrilamida 15% das amostras nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 horas de indução em <i>E. coli</i> BL 21 Star™ (DE3) pLysS.	61
Figura 16 - Gel de poliacrilamida 15% mostrando sobrenadantes obtidos da indução de expressão em <i>E. coli</i> BL 21 Star™ (DE3) pLysS, pré e pós lise bacteriana e com diferentes tampões de lavagem.	61
Figura 17 - Gel de poliacrilamida 15% mostrando a banda referente à APLOrEC/pET28 na curva de gradiente de uréia.	62
Figura 18 - Gel de poliacrilamida 15% de amostras antes e depois da purificação por Dynabeads Histag.	63
Figura 19 - Western Blot do extrato bruto e da proteína recombinante purificada.....	64
Figura 20 - Microplaca de 96 poços mostrando o efeito protetor da APLOrEC (0,5 µg/ml) e da HB 2,5% (v / v) em diferentes diluições de T-BHP e H ₂ O ₂	65
Figura 21 - Análise microscópica do efeito protetor da APLOrEC em células VERO com morte induzida por 20 e 4 mM de H ₂ O ₂	67
Figura 22 - Análise por microscópio confocal da manutenção do citoesqueleto de células VERO tratadas com APLOrEC (0,5 µg/ml), induzidas por H ₂ O ₂ e marcadas com FITC-Faloidina e iodeto de propídio.	69

Figura 23 - Análise por microscópio de fluorescência da manutenção do citoesqueleto de células L929 tratadas com 0,5 µg / ml de APLOrEC durante 1 hora, induzidas a morte por H ₂ O ₂ durante 24 horas e marcadas com FITC-Faloidina e iodeto de propídio.....	70
Figura 24 - Domínio conservado de hemocianina C presente na sequência da proteína antiapoptótica.	71
Figura 25 - Domínios conservados encontrados em <i>Manduca sexta</i>	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre sistemas de expressão de recombinantes utilizados para biofármacos.....	31
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens das diferentes estratégias de produção de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	33
Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação e clonagem da sequência da proteína APLOrEC	40
Tabela 4 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores M13 <i>Forward</i> e <i>Reverse</i>	41
Tabela 5 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores T7 <i>Promoter</i> e <i>Terminator</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – grau Centígrados

µg - micrograma

µl - microlitro

µm - micrômetro

APLOR_{EC} – Antiapoptótica de *Lonomia obliqua* recombinante em *E. coli*

ATP – trifosfato de adenosina

BL21 (DE3) pLysS – linhagem bacteriana para expressão de recombinantes

BLQC – linhagem bacteriana BL21 (DE3) pLysS quimiocompetente

BSA – albumina sérica bovina

CaCl₂ – cloreto de cálcio

cDNA – DNA complementar

Células VERO – células fibroblásticas renais de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*)

Células L929 – células fibroblásticas de camundongo (*Mus- musculus*)

DNA – ácido desoxirribonucleico

ddNTPs – dideoxirribonucleosídeos trifosfatados

dNTP– dexoxinucleotídeos

DTT – ditioneitol (reagente redutor)

DO – densidade óptica

E. coli- *Escherichia coli*

EMC - encefalomiocardite

g– força gravitacional

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HB ou Hb – hemolinfa bruta de *Lonomia obliqua*

His – histidina

Ig G – imunoglobulina G

IPTG – isopropyl-β-D-thiogalactoside

IMAC – cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados

JM109 – linhagem bacteriana para clonagem

JMQC – linhagem bacteriana JM 109 quimiocompetente

Kb – kilobase

KDa– quilodalton

L15 – meio Leibovitz (Cultilab®)

LB – Luria Bertani

LB-ágar – Luria Bertani complementado com ágar

L. obliqua - lagarta *Lonomia obliqua*

mM – milimolar

M – Molar

mA- mili ampére

MgCl₂– cloreto de magnésio

mg – miligrama

ml – mililitro

NaCl – cloreto de sódio

ng– nanograma

nm - nanômetro

pb – pares de base

PBS – phosphate buffered saline

PBST - phosphate buffered saline complementado com Tween™-20

PCR – polymerase chain reaction

pCRII-TOPO – vetor de clonagem

pET28a–vetor de expressão

pH – potencial hidrogeniônico

PM – peso molecular

primer – oligonucleotídeos iniciador

rpm – rotação por minuto

RNA – ácido ribonucléico

RNA_m – RNA mensageiro

RT-PCR - reverse transcription polymerase chain reaction

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SFB – soro fetal bovino

SOC *Medium*– meio de cultura nutritivo com repressor catabólico

Taq polymerase – enzima polimerase de *Thermus aquaticus*

T-BHP– tert- butyl hydrogen peroxide

TPA – ativador de plasminogênio espécie- específico

UFCSPA-RS – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre- Rio Grande do Sul

V- Volts

W - Watts

X-GAL – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 <i>Lonomia obliqua</i> , Walker 1855 (Lepidoptera: Saturniidae)	20
1.2 A hemolinfa de insetos e a indústria farmacêutica.....	23
1.3 Identificação de propriedades antiapoptóticas da hemolinfa de <i>L. obliqua</i>	23
1.3.1 <i>Hemolinfa</i>	23
1.4 Identificação da sequência do gene que codifica para a proteína antiapoptótica	24
1.5 A morte celular e suas características.....	24
1.5.1 <i>Apoptose</i>	25
1.5.1.1 <i>Vias de sinalização e o papel determinante das mitocôndrias no processo apoptótico</i>	27
1.5.2 <i>Necrose</i>	29
1.6 O sistema de expressão de proteínas recombinantes	30
1.7 Importâncias da obtenção desta proteína em maior quantidade	33
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Esquema dos experimentos realizados.....	36
3.2 Linhagens empregadas neste trabalho	36
3.2.1 <i>Linhagens bacterianas</i>	36
3.2.2 <i>Linhagens de cultivos celulares</i>	37
3.3 Vetores.....	37
3.3.1 <i>Vetor pCR™ II-TOPO® (Thermo - Invitrogen)</i>	37
3.3.2 <i>Vetor pET28a® (Novagen™)</i>	38
3.4 Construção da sequência codificadora para a proteína antiapoptótica.....	39
3.5 Oligonucleotídeos iniciadores	40
3.5.1 <i>Construção dos oligonucleotídeos iniciadores</i>	40
3.5.2 <i>Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em vetor pCR™ II-TOPO®</i>	41
3.5.3 <i>Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em vetor pET28a</i>	41
3.6 Extração de RNA mensageiro (RNAm) e síntese de DNA complementar (cDNA) a partir do tegumento de <i>L. obliqua</i>	41

3.7 Amplificação da sequência de interesse	42
3.8 Clonagem das sequências de interesse em vetor pCR™ II-TOPO®	43
3.8.1 Purificação dos fragmentos obtidos por PCR e dosagem dos mesmos	43
3.8.2 Reação de ligação dos insertos ao vetor pCR™ II-TOPO®	44
3.8.3 Preparação de bactérias quimiocompetentes	44
3.8.4 Transformação do plasmídeo recombinante em bactérias JMQC	45
3.8.5 Análise dos transformantes e triagem por PCR	45
3.8.6 Extração de DNA plasmidial e dosagem.....	46
3.8.7 Sequenciamento dos clones em vetor pCR™ II-TOPO®	46
3.9 Subclonagem da sequência de interesse em vetor de expressão pET28a	46
3.9.1 Purificação e dosagem do vetor pET28a e da sequência clonada.....	46
3.9.2 Reação de ligação dos insertos ao vetor de expressão pET 28a	47
3.9.3 Transformação dos clones recombinantes em bactérias BLQC.....	47
3.9.4 Análise dos transformantes e triagem por PCR	47
3.9.5 Sequenciamento dos clones em vetor pET28a.....	48
3.10 Indução da expressão da proteína antiapoptótica e análise por eletroforese em gel poliacrilamida SDS-PAGE	49
3.10.1 Lise bacteriana	50
3.10.2 Gradiente de uréia	50
3.10.3 Purificação da proteína recombinante	51
3.10.4 Diálise da proteína purificada.....	51
3.10.5 Dosagem da proteína recombinante.....	51
3.10.6 Detecção da proteína antiapoptótica recombinante por anticorpo anti-histidina ...	52
3.11 Análises de apoptose celular	53
3.11.1 Determinação do efeito protetor da APLOrEC purificada e da hemolinfa bruta em células VERO	53
3.11.2 Determinação da alteração do citoesqueleto de células VERO por microscópio confocal a laser LSM 510 META (Zeiss) e de L929 por microscópio de flourescência (AXIO VERT. A1) após indução de apoptose,e efeito da APLOrEC na manutenção desta estrutura	54
3.12 Análises de bioinformática	55
4 RESULTADOS	56
4.1 Análise da sequência da proteína recombinante antiapoptótica de <i>L. obliqua</i>	56

4.1.1 Amplificação da sequência da proteína de interesse	56
4.2 Clonagem das sequências de interesse em vetor pCR™ II-TOPO®	57
4.2.1 Transformação do plasmídeo recombinante em bactérias JMQC	57
4.2.2 Análise dos transformantes em JMQC e triagem por PCR.....	57
4.3 Sequenciamento dos clones em vetor pCR™ II-TOPO®	58
4.4 Subclonagem da sequência de interesse em vetor de expressão pET28a.....	58
4.4.1 Purificação e dosagem dos plasmídeos recombinantes e do vetor pET28a.....	58
4.4.2 Reação de ligação dos insertos ao vetor pET28a	58
4.4.3 Transformação dos clones recombinantes em bactérias BLQC.....	59
4.4.4 Análise dos transformantes em BLQC e triagem por PCR.....	59
4.5 Sequenciamento dos clones em vetor pET28a	59
4.6 Indução da expressão da proteína recombinante e análise por eletroforese em gel poliacrilamida SDS-PAGE	60
4.6.1 Gradiente de uréia	62
4.6.2 Purificação da proteína	62
4.6.3 Diálise e dosagem da proteína recombinante	63
4.6.4 Western Blot.....	63
4.7 Análises de apoptose celular	64
4.7.1 Determinação do efeito protetor da APLOrEC purificada e da hemolinfa bruta em células VERO	64
4.7.2 Análise microscópica da morte por apoptose em células VERO e determinação da alteração do citoesqueleto e efeito protetor da APLOrEC na manutenção desta estrutura por microscópio confocal e de células L929 por microscópio de fluorescência após indução de apoptose	66
4.8 Análises de Bioinformática.....	70
5 DISCUSSÃO	72
6 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Lonomia obliqua*, Walker 1855 (Lepidoptera: Saturniidae)

Lonomia obliqua, Walker 1855 (Lepidoptera, Saturniidae) é uma mariposa pertencente ao filo *Artropoda*, classe *Insecta*, ordem *Lepidoptera*, família *Saturniidae*, e gênero *Lonomia*. O gênero *Lonomia* foi inicialmente descrito por Walker (*L. achelous*) no Suriname, porém foi encontrado também no restante da região zoogeográfica neo-tropical, distribuído nas Guianas, Trinidad, Venezuela, Equador, Colômbia, Costa Rica, Panamá, Guatemala, México, Honduras, El Salvador, Nicarágua, Peru, Argentina e Brasil (FRAILHA-NETO et al.,1992; LEMAIRE, 1972).

Dados bibliográficos descrevem a existência de seis estágios larvais (ínstares) em um período de aproximadamente 94 dias, podendo atingir até sete centímetros antes de assumirem a fase de pupa, a qual representa um período bastante diversificado, podendo oscilar de 46 a 92 dias. Posteriormente à fase de pupa, as mariposas atingem a fase adulta (Figura 1), onde ocorre o dimorfismo sexual, sendo a mariposa fêmea maior do que a mariposa macho. Quanto à coloração, a fêmea exibe coloração pardoroso enquanto o macho apresenta um tom amarelado mais vibrante. Ambas as mariposas possuem uma listra transversal sobre as asas.

O ciclo de vida da *L. obliqua* é de no mínimo quatro meses e meio, podendo se completar em até oito meses e meio aproximadamente (LORINI, 1999; MORAES, 1997).

Figura 1 - Ciclo completo da metamorfose de *L. obliqua*

A) ovos **B)** lagarta de último ínstar **C)** pupa **D)** mariposa macho **E)** mariposa fêmea.

Fonte: Cedidas por Moraes, R. H. P.

Apesar de ser encontrada em todo Brasil, a lagarta *L. obliqua* é mais abundante na região Sul. Sobrevivem em matas úmidas, parques arborizados e pomares domésticos, sempre agregadas em colônias (Figura 2) e na mesma árvore-mãe (hospedeira), alimentando-se das folhas de várias espécies vegetais (MORAES, 1997). Esta lagarta tem ocorrência sazonal, restrita aos meses de novembro a março, sendo disponível para experimentos ou produção de soro antilônômico somente quando enviada a partir das localidades de coleta.

O caminho percorrido pelas lagartas em busca do alimento é denominado como “procecionismo” – vem de procissão, que é o ato de caminhar em fila indiana, fenômeno este, que ocorre por conta da liberação de um ferormônio de agregação secretado pelas mesmas (MORAES, 1997).

Figura 2 - Hábito gregário das lagartas *L. obliqua*

Hábito gregário das lagartas *L. obliqua*, localizadas sempre na mesma árvore-mãe e agregadas em colônias.

Fonte: Adaptado de CARMO, 2012.

Devido às características morfológicas das lagartas, como a coloração marrom esverdeada, são facilmente camufladas no meio em que vivem, principalmente quando estão em repouso (MORAES, 1997).

A *L. obliqua* possui grande importância médica. Esta lagarta apresenta o corpo revestido de cerdas urticantes (espículas) durante a fase larval e que liberam toxinas com característica inflamatória quando em contato com a vítima, provocando acidentes graves. A ocorrência de acidentes é bastante relatada no sul e sudeste do Brasil (DUARTE et al.,1990). Durante o contato, a toxina liberada pelo rompimento das espículas, ocasiona dor e queimação intensa no local, podendo prosseguir para cefaleia e náuseas. Aproximadamente após 8 a 72 horas da ocorrência do acidente, aparecem os sintomas de síndrome hemorrágica de forma intensa em humanos, podendo levar a morte se porventura a vítima não fizer uso do soro antilonômico, que é produzido pelo Instituto Butantan desde 1994 e faz parte da agenda de soros do Ministério da Saúde (AROCHA-PINANGO; GUERRERO, 2001; CARMO, 2012; DUARTE et al.,1990).

1.2 A hemolinfa de insetos e a indústria farmacêutica

A classe *Insecta* é a maior classe de animais do planeta, constituída por aproximadamente 10 milhões de espécies (GARCIA, 1995). Os insetos são encontrados em quase todos os ecossistemas do planeta, e esta vasta disseminação e adaptação a regiões diversificadas, tem despertado curiosidade entre pesquisadores e incentivado pesquisas de novos agentes terapêuticos nesta classe de artrópodes (CHERNYSH et al.; 2002).

Em numerosos estudos, tem sido observado a presença de substâncias farmacologicamente ativas na hemolinfa de insetos, com ação imune, antibacteriana e antifúngica (LAMBERT et al., 1999; LOWENBERGER et al., 1999; ZHU et al., 2000), com efeitos hormonais (HUBERMAN et al., 2000; JONES; MANCZAK; HORN, 1993; KURATA et al., 1994; LIN et al., 1998; VERMUNT; VERMEESCH; KORT, 1997), efeitos enzimáticos (HAMDAOUI et al., 1998; SHIOTSUKI et al., 2000; YAMAMOTO et al., 1999) e efeito anticongelamento (PETERS et al., 1993).

O efeito da hemolinfa sobre o crescimento e tempo de sobrevivência em células de cultivo foi demonstrado pela primeira vez por Wyatt e Grace nas décadas de 1950 e 1960 e posteriormente, poucos trabalhos foram realizados com a mesma finalidade. Somente após muitos anos, surgiram trabalhos que evidenciaram a eficácia da hemolinfa no controle do crescimento viral (KANAYA; KOBAYASHI, 2000; RHEE; KIM; PARK, 1999; RHEE; PARK, 2000), na expressão de proteínas recombinantes (MENDONÇA et al., 2008; WOO et al., 1997) e também o efeito antiapoptótico em células de inseto (SOUZA et al., 2005).

Assim sendo, a continuidade dos estudos sobre essa gama de proteínas ativas biologicamente já conhecidas, assim como a descoberta de novas proteínas, é de extrema importância para a indústria farmacêutica, que hoje, tem papel extremamente ativo na área de produção de proteínas recombinantes (DEMAIN; VAISHNAV, 2009; FERRER- MIRALLES et al., 2009).

1.3 Identificação de propriedades antiapoptóticas da hemolinfa de *L. obliqua*

1.3.1 Hemolinfa

Em um estudo inicial, Souza e colaboradores (2005), isolaram e purificaram a proteína obtida a partir da hemolinfa da lagarta. Neste estudo, a hemolinfa bruta foi

submetida a um sistema de cromatografia líquida de alta resolução AKTA purifier (Amersham Pharmacia Biotech). A amostra foi aplicada em uma coluna de cromatografia gel filtração “Sephacryl 200” e as frações obtidas foram utilizadas para determinação de seu perfil eletroforético em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Posteriormente, foram testadas em cultivos celulares para a determinação do efeito biológico.

Para melhor purificação da proteína, a subfração que apresentou atividade antiapoptótica foi aplicada em colunas de gel filtração “Superdex 75 e Superdex peptide” e analisada quanto à sua atividade antiapoptótica em cultivo celular e também analisada em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, determinando o peso molecular da proteína antiapoptótica (SOUZA et al., 2005).

1.4 Identificação da sequência do gene que codifica para a proteína antiapoptótica

A identificação da sequência do gene que codifica para a proteína com ação antiapoptótica encontrada na hemolinfa de *L. obliqua* foi alcançada através de estudos prévios do material isolado por Souza em 2005. A proteína isolada foi submetida a sequenciamento e pudemos obter a sua sequência de aminoácidos. Esta sequência foi traduzida para nucleotídeos e comparada com a biblioteca de cDNA desta lagarta produzida por Veiga et al., 2005. Confirmada a existência da mesma no banco de cDNA, passamos a obtenção de um cDNA a partir do RNAm extraído do tegumento de um espécime de *L. obliqua*.

Posteriormente à obtenção do cDNA e sua amplificação, foi construído um plasmídeo contendo a respectiva sequência da proteína antiapoptótica, juntamente a uma cauda de histidina nas porções N e C terminal para posteriormente serem expressas em um sistema bacteriano de expressão heteróloga.

1.5 A morte celular e suas características

A palavra morte vem do latim *mors*, que se refere ao processo irreversível de interrupção das atividades biológicas necessárias à manutenção da vida de um organismo vivo. Quando as células sofrem perturbações e se tornam incapazes de se manterem em

homeostasia, ocorre a morte celular, que pode ser classificada de acordo com a intensidade do sinal recebido pela célula. Este estímulo captado pela célula pode ser fisiológico ou patológico, sendo caracterizado na literatura por dois tipos distintos: apoptose e necrose, respectivamente (CARVALHO, RECCO-PIMENTEL., 2007).

Existem diversos fatores que podem levar ao processo de morte celular, tais como: mudanças no pH ou tensão de oxigênio, estresse hidrodinâmico, depleção de nutrientes (MENDONÇA et al., 2002; MENESES-ACOSTA et al., 2001), ação de agentes tóxicos e infecção por vírus (CARTIER; HERSHBERGER; FRIESEN, 1994).

1.5.1 Apoptose

A morte celular programada ou apoptose é um processo de eliminação de células supérfluas ou defeituosas, após estímulos fisiológicos normais, altamente regulado e essencial para o crescimento e sobrevivência em todos os eucariotos (WERTZ; HANLEY, 1996).

O termo apoptose, originado do grego, apo = a partir e ptose = queda, foi usado inicialmente para descrever “o cair das pétalas das flores e as folhas das árvores”. Em meados de 1885, surgiram os primeiros relatos de morte celular: o suicídio celular ao qual Kerr e colaboradores (1972), concederam o termo apoptose, distinguindo-a de necrose, onde se descreve que as células fisiologicamente indesejáveis não necrosam, elas entram em processo de apoptose.

Muitas vezes, o “suicídio” das células não está programado, mas ocorre em resposta a fatores que podem ameaçar o resto do organismo, como por exemplo: a infecção viral, onde a célula infectada é eliminada antes do ciclo de infecção se completar e assim, prevenindo o contágio para as células vizinhas; a lesão no genoma de células que possa induzir alguma transformação cancerosa e como resposta a essa lesão, a célula aumenta o nível da proteína p53 que é indutora de apoptose; como também as células cancerosas que são induzidas a apoptose pela radiação e drogas citotóxicas utilizadas na terapia contra o câncer. A priori, sabe-se que no tecido onde houve morte celular e não existem sinais de reação inflamatória, provavelmente a morte se deu por apoptose (RANGANATH; NAGASHREE, 2001; SHULER; MAURER; GOLDSTEIN, 2003).

Morfologicamente, o processo de apoptose apresenta características específicas, tais como: formação de vacúolos citoplasmáticos, retração celular e diminuição do contato entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear e condensação da cromatina na periferia do núcleo. Também ocorre despolarização da membrana mitocondrial, fragmentação do DNA e alteração dos fosfolípidos da membrana plasmática (SARASTE; PULKKI, 2000).

Os primeiros sinais de apoptose (Figura 3A) acontecem no núcleo, com espaços nas cisternas perinucleares e condensação da cromatina na periferia nuclear. Já no citoplasma, as mitocôndrias, o retículo endoplasmático e aparelho de Golgi estão dilatados. Com a evolução do processo de apoptose (Figura 3B) é possível observar a presença de cinco aglomerados distintos de heterocromatina dispostos em círculo, o típico núcleo apoptótico. Há fragmentação do retículo endoplasmático, formando pequenas vesículas e as mitocôndrias também sofrem alteração, assim como o complexo de Golgi. A membrana celular já não apresenta mais micro vilosidades como numa célula viável (FRESHNEY, 2005). O estágio tardio (Figura 3C) é caracterizado pela fragmentação do conteúdo citoplasmático, levando à formação dos corpos apoptóticos, os quais serão fagocitados por células vizinhas, ou por macrófagos (SARASTE; PULKKI, 2000).

Figura 3 - Processo evolutivo da morte celular por apoptose em célula VERO

A) Indício de apoptose no núcleo, com espaços na membrana perinuclear e início de condensação da cromatina na periferia nuclear. As organelas presentes no citoplasma estão dilatadas. **B)** Núcleo apoptótico característico (círculo azul), evidenciando cinco aglomerados distintos de heterocromatina dispostos em círculo. Em detalhe, no canto superior da figura B, uma célula em apoptose no mesmo estágio, observado em microscópio de fluorescência. **C)** Estágio tardio do processo de evolução de apoptose, onde se observa a eliminação de um corpo apoptótico contendo heterocromatina (seta verde) e deterioração das mitocôndrias. Núcleo (N); Mitocôndrias (m); RE (retículo endoplasmático); Aparelho de Golgi (G); Heterocromatina (Ch); Ribossomos (r); Vacúolos (v).

Fonte: Modificada de Mendonça et al., 2002.

O processo de morte por apoptose é irreversível e o seu retardo é um fator de grande importância em processos biotecnológicos, podendo aumentar a viabilidade celular e assim proporcionando condições ideais de cultivos celulares (MENDONÇA et al., 2002).

Alguns trabalhos relataram a ocorrência de morte celular por apoptose em cultivos de células de mamíferos e de insetos com depleção de nutrientes (MENDONÇA et al., 2002; MENESES-ACOSTA et al., 2001) e que a suplementação dessas culturas com hemolinfa de *L. obliqua* pode estender a viabilidade da cultura evitando a morte por apoptose (MARANGA et al., 2003; RAFFOUL et al., 2005).

Também foi certificado que a hemolinfa de *L. obliqua* é capaz de inibir morte por apoptose em cultivos de células de inseto *Spodoptera frugiperda* (Sf-9), provocada por depleção de nutrientes ou por agentes químicos, como por exemplo, o Tert-butyl e o peróxido de hidrogênio. E a partir da hemolinfa, a proteína com o efeito antiapoptótico foi isolada e purificada (SOUZA et al., 2005)

A adição da hemolinfa de *L. obliqua* ao cultivo de células infectadas com vírus EMC, em condições de depleção de nutrientes ou onde ocorre presença de agentes químicos tóxicos, pode levar a uma proteção celular e a um prolongamento da viabilidade celular, permitindo uma maior replicação viral e, conseqüentemente, levar a um aumento na produção de proteínas recombinantes expressas por baculovírus (CARMO et al., 2012). O baculovírus já possui uma proteína antiapoptótica (p35), a qual permite uma sobrevivência aos cultivos infectados, permitindo ao vírus se reduplicar (HERSHBERGER; LACOUNT; FRIESEN, 1994).

Destes trabalhos, ficou constatado que na hemolinfa da lagarta utilizada para este estudo, existem moléculas de grande interesse biotecnológico, sendo elas: potencializadora do crescimento celular, coadjuvantes da produção de proteínas recombinantes, e de ação antiviral e antiapoptótica.

1.5.1.1 Vias de sinalização e o papel determinante das mitocôndrias no processo apoptótico

A ativação da morte celular por apoptose é bem descrita por dois mecanismos: via extrínseca (ou citoplasmática) e via intrínseca (ou mitocondrial), que diferem uma da outra de acordo com o tipo de estímulo recebido (FULDA; DEBATIN, 2006).

Em ambas as rotas, as mitocôndrias são consideradas fundamentais para a regulação da morte celular por apoptose, principalmente na via intrínseca, onde o estresse sofrido pela célula age diretamente sob esta organela, e na via extrínseca, ela funciona como um elemento agravante da morte celular (GREEN; KROEMER, 2005).

Habitualmente, o sinal que a célula recebe para iniciar o processo de apoptose é externo e se inicia por meio de um receptor de superfície, onde há interação entre ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana, também específicos. Existem dois receptores: TNF-R1 (receptor fator de necrose tumoral), o qual interage com o fator de necrose tumoral (TNF) produzido por células do sistema imunológico e o Fas (também chamado de CD95 ou Apo-1), ambos possuem na face externa da membrana plasmática o sítio de ligação específico e também um “domínio de morte”, que é uma região composta por 80 aminoácidos responsável pela transmissão do sinal de autodestruição através da membrana para as proteínas citosólicas TRADD (domínio de morte associado ao TNF) e FADD (domínio de morte associado ao Fas), respectivamente, sendo que este último domínio de morte pode ativar a protease citosólica caspase-8, e quando ativada, estimula a caspase-3 que por sequência impulsiona outras caspases efetoras responsáveis pelo início da cascata de morte (KRAMMER, 2000).

Caspases são enzimas que participam do processo de apoptose com atividade proteolítica, mas são ativas somente após sofrerem clivagem. Recebem este nome por possuírem um resíduo de cisteína no sítio ativo. Todas as enzimas denominadas caspases, hidrolisam suas proteínas-alvo com resíduos específicos de ácido aspártico (STRASSER et al., 2009).

A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular, como por exemplo, danos no DNA, redução de fatores de crescimento ou hipóxia, os quais agem diretamente na mitocôndria e esta, sofrerá um colapso funcional e estrutural. Essa alteração na estrutura mitocondrial leva à ruptura da organela e consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma, que também podem ser ativadores da cascata de caspases, como o citocromo c, que ao ser liberado no meio intermembranar, se agrega as proteínas Apaf-1 e caspase-9 formando o apoptossomo, que por fim, ativará as caspases efetoras da cascata de apoptose (GREEN; KROEMER, 2005; VIEIRA et al., 2000).

1.5.2 Necrose

O termo necrose vem do latim *necrôsis*, que por sua vez deriva de um vocábulo grego e que significa morte por estado alterado de saúde.

Diferente de apoptose, a morte celular por necrose acontece sempre por processo patológico e é causada por traumatismo ou doença. Em células de mamíferos e insetos, a necrose é morfologicamente caracterizada por inchaço citoplasmático e mitocondrial, perda de integridade da membrana, ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo celular, resultando em um processo inflamatório local (Figura 4). Essa reação inflamatória pode causar injúria e até morte das células vizinhas (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

Apoptose e necrose são comumente encontradas em humanos, sendo a apoptose de ocorrência natural, a qual acontece desde o desenvolvimento embrionário-fetal até ao longo da vida adulta (RANGANATH; NAGASHREE, 2001).

Figura 4 - Diferenças entre morte celular por apoptose e por necrose.

Diferença dos acontecimentos na morte por apoptose e na necrose.

Fonte: Modificado de GRIVICICH, I., REGNER, A., ROCHA, A.B.D., 2007.

1.6 O sistema de expressão de proteínas recombinantes

Com o grande desenvolvimento e evolução da Biotecnologia, uma das aplicações práticas que tem se destacado é a expressão de genes exógenos em bactérias e leveduras, ou mesmo em células de metazoários complexos, como células de insetos, através da tecnologia de DNA recombinante, a qual permitiu a obtenção de importantes produtos terapêuticos em escala comercial, como: insulina, vacina para hepatite B, hormônio de crescimento, ativador de plasminogênio espécie-específico (TPA), alfa-interferon, apontando a produção de proteínas recombinantes em laboratório uma das áreas mais importantes para a indústria farmacêutica (GARCIA; CHAMAS, 1996; KRETZMER, 2002).

A primeira proteína terapêutica humana licenciada através da utilização da tecnologia de DNA recombinante foi a insulina, em 1982, produzida em larga escala em *Escherichia coli* (*E. coli*), que apresenta crescimento mais rápido e robusto comparado com o de células animais (BROUSSEAU et al., 1982; RIGGS, 1981).

Em 2007, cerca de metade dos produtos biofarmacêuticos em fase de testes clínicos, foram produzidos através da tecnologia de proteínas recombinantes e até hoje, movimentam bilhões de dólares ao ano, com um crescimento acelerado, proporcionando um grande impacto na saúde e na qualidade de vida da população mundial (MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2007).

As proteínas são moléculas biológicas essenciais das células, presentes em todos os seres vivos e que participam de praticamente de todos os processos celulares, podendo exercer diversas funções, entre elas, a catálise enzimática, transporte molecular, nutrição, motilidade, estrutura, defesa, sinalização, entre outras. No aspecto químico, são macromoléculas constituídas de uma sequência de 20 aminoácidos, denominada cadeia polipeptídica, que pode variar de 100 a 2.000 resíduos de aminoácidos e assim, determinam a estrutura primária. A sequência dos aminoácidos de uma proteína caracteriza o tipo de conformação que ela irá apresentar (estrutura secundária) e por fim, o enovelamento das estruturas secundárias e as posições específicas de cada átomo na proteína, determinam a estrutura terciária, ou seja, a função biológica específica (WANG; ROBERTS, 2010).

A escolha do sistema de expressão é essencial para o sucesso da produção de uma proteína heteróloga e é inteiramente dependente do tipo de proteína que se deseja obter, visando melhor funcionalidade protéica e rendimento da produção e purificação. Essa seleção muitas vezes é realizada com base em fatores complexos, tais como o efeito

desejado da proteína, as propriedades físico-químicas, as modificações pós-traducionais e custo-benefício da produção. Devido a esses fatores, assim como pelas vantagens e desvantagens apresentadas por cada sistema, a escolha por um deles para a realização de um estudo deve ser feita de maneira detalhada, visando sempre o tipo de proteína que se pretende estudar (Tabela 1) (CHA et al., 2005).

Tabela 1 - Comparação entre sistemas de expressão de recombinantes utilizados para biofármacos

	E.coli	Levedura	Inseto	Mamíferos
Taxa de crescimento	Muito rápido	Rápido	Lento	Lento
Rendimento de expressão (peso seco)	Alto (1-5%)	Alto (>1%)	Muito alto (30%)	Muito baixo (<1%)
Produtividade	Muito alto	Alto	Alto	Baixo
Custo do meio	Muito baixo	Baixo	Alto	Muito alto
Técnicas de cultura	Muito fácil	Fácil	Difícil	Muito difícil
Custo de produção	Muito baixo	Baixo	Alto	Muito alto
Enovelamento da proteína	Razoável	Bom	Muito bom	Muito bom
Glicosilação simples	Não	Sim	Sim	Sim
Glicosilação complexa	Não	Não	Sim ^a	Sim
Secreção	Pobre	Muito bom	Muito bom	Muito bom
Funcionalidade da proteína eucariótica expressa	Pobre	Bom	Muito bom	Muito bom
Viabilidade de sistemas genéticos	Muito bom	Bom	Razoável	Razoável
Problemas pirogênicos	Possível	Não	Não	Não

^a - Padrões de glicosilação diferentes de células de mamíferos

Fonte: Modificado de Cha et al., 2005.

O sistema de expressão que utiliza a bactéria é um dos mais utilizados para obtenção de proteínas heterólogas, em especial a bactéria gram negativa *E. coli*, em virtude de um alto crescimento em menor tempo de produção, além de apresentar uma técnica de cultura de fácil manipulação e por ter expressão e linhagens bem caracterizadas quando comparado aos outros sistemas.

Embora não haja nenhuma garantia de que um produto de gene recombinante produzido em *E. coli* seja obtido em níveis elevados e na forma biologicamente ativa, uma quantidade considerável de esforço tem sido direcionada para a melhoria do desempenho e versatilidade deste microrganismo. A proteína deve ser preferencialmente enovelada em sua conformação nativa, determinando assim, sua função biológica. Habitualmente, o rendimento da proteína expressa é alto, podendo ocorrer extracelularmente, diretamente

no periplasma ou utilizar um sistema de secreção, ou ocorrer intracelularmente, gerando um produto solúvel ou insolúvel sob a forma de corpúsculo de inclusão, dificultando a incorporação dos aminoácidos subsequentes e representando obstáculos para a expressão de genes heterólogos (Tabela 2). Portanto, uma das principais considerações na produção de uma proteína recombinante em *E. coli*, é a estratégia de produção (BANEYX, 1999; JONASSON et al., 2002).

Ao longo de mais de duas décadas, muitas estratégias genéticas têm sido utilizadas para aperfeiçoar os bioprocessos bacterianos e simplificar os procedimentos de recuperação da proteína recombinante, como a adaptação do produto gênico para um tipo de purificação específica, a escolha de vetores eficientes e a melhoria das cepas bacterianas de produção em diferentes aspectos. Devido às vantagens apresentadas pelo sistema bacteriano, sua aplicação é uma opção a ser considerada para uma primeira tentativa de expressar a proteína de interesse e os sistemas de expressão restantes, como alternativas quando o produto expresso for biologicamente inativo após a sua produção, devido à falta de modificações pós-traducionais, dobramento incorreto ou quando a recuperação da proteína nativa for muito baixa (JONASSON et al., 2002).

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens das diferentes estratégias de produção de proteínas recombinantes em *E. coli*

Estratégias de produção	Vantagens	Desvantagens
Secreção/ vazamento para o meio extracelular	<ul style="list-style-type: none"> - possível formação de dissulfeto - extensa proteólise pode ser evitada - possível obtenção do N- terminal autêntico - redução dos níveis de contaminantes - não há necessidade de rompimento celular 	<ul style="list-style-type: none"> - usualmente, a secreção para o meio externo não é possível - diluição do produto
Produção periplásmica	<ul style="list-style-type: none"> - possível formação de dissulfeto - possível obtenção do N- terminal autêntico - redução dos níveis de contaminantes 	<ul style="list-style-type: none"> - a secreção para o periplasma nem sempre é possível - não existe um processo de larga escala para liberação seletiva de proteínas periplásmicas - proteases periplásmicas podem causar proteólise
Produção intracelular com corpúsculos de inclusão	<ul style="list-style-type: none"> - corpos de inclusão são facilmente isolados - protegido de proteases - a proteína é inativa e não prejudica a célula - rendimento da produção geralmente é elevado 	<ul style="list-style-type: none"> - solubilização e dobramento in vitro necessário, resultando em rendimento mais baixo e custo mais elevado - normalmente N- terminal não autêntico
Produção intracelular de produto solúvel	<ul style="list-style-type: none"> - não há necessidade de solubilização e redobramento 	<ul style="list-style-type: none"> - elevado nível de produto intracelular, que pode ser prejudicial para as células - processo de purificação complexo - pode ocorrer proteólise - usualmente não ocorre formação de dissulfeto - normalmente N-terminal não autêntico

Fonte: Modificado de JONASSON et al., 2002.

1.7 Importâncias da obtenção desta proteína em maior quantidade

Além das aplicações em biotecnologia, proteínas inibidoras de apoptose, podem ser de grande importância médica em doenças neurodegenerativas, onde o processo de apoptose tem um papel relevante, como o mal de Alzheimer (GREEN; KROEMER, 2005).

Não foram encontrados na literatura, estudos sobre a expressão da proteína em questão, sendo este, o primeiro trabalho a ser realizado com o propósito de se obter a proteína antiapoptótica recombinante de *L. obliqua*.

A expressão heteróloga em bactéria foi empregada com o objetivo de minimizar o custo, facilitar o processo, assim como também obter o máximo de rendimento da proteína, já que essas são características que devem ser levadas em consideração em um projeto de estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é a expressão e purificação de uma proteína com ação antiapoptótica, extraída do tegumento de *Lonomia obliqua* em sistema de expressão bacteriano, que utiliza *Escherichia coli*.

2.2 Objetivos específicos

- Construir um plasmídeo, contendo a sequência que caracteriza a proteína antiapoptótica de *L. obliqua*;
- Expressar a proteína antiapoptótica recombinante obtida de *L. obliqua* (APLOrEC) em sistema bacteriano, utilizando *E.coli*;
- Analisar o rendimento da proteína obtida;
- Avaliar a atividade da proteína antiapoptótica recombinante em cultivo celular, linhagen VERO e L929.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Esquema dos experimentos realizados

Para facilitar a visualização das etapas realizadas, a figura 5 mostra a ordem temporal em que os experimentos foram realizados.

Figura 5 - Cronograma do experimento

Fonte: Mazzoni, M.K.F., 2015.

3.2 Linhagens empregadas neste trabalho

3.2.1 Linhagens bacterianas

O microrganismo utilizado neste trabalho pertence à espécie bacteriana *E.coli*, linhagens JM 109 e BL 21 Star™ (DE3) pLysS.

A linhagem JM 109 foi utilizada para clonagem de DNA. A clonagem ocorre de forma eficiente, devido a esta linhagem possuir o fenótipo mutante *recA*. A bactéria mutante não possui o sistema de restrição de *E. coli* K, ou seja, a restrição indesejável de DNA clonado e recombinação com DNA cromossômico do hospedeiro não são possíveis.

A linhagem BL 21 Star™ (DE3) pLysS foi empregada para a expressão da proteína recombinante, pois é uma linhagem modificada para otimizaçãoda produção de recombinantes (Thermo - INVITROGEN™, 2010).

O plasmídeo pLysS produz lisozima T7, que inibe o nível basal de expressão do gene de interesse, recomendado quando a proteína é tóxica ou interfere no metabolismo bacteriano. Também confere resistência ao antibiótico cloranfenicol (Thermo - INVITROGEN™, 2010).

3.2.2 Linhagens de cultivos celulares

Células VERO (células fibroblásticas renais de macaco verde africano-*Cercopithecus aethiops*) e **Células L929** (células fibroblásticas de camundongo- *Mus musculus*) foram cultivadas a 37 °C em frascos Tcontendo 5 ml de meio Leibovitz (L-15) da Cultilab®, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB- Cultilab®). Estas células foram utilizadas nos testes de atividade antiapoptótica da proteína recombinante, em microplacas de 96 e ou 24 poços.

3.3 Vetores

3.3.1 Vetor pCR™ II-TOPO® (Thermo - Invitrogen)

O vetor pCR™ II-TOPO® (Figura 6) foi utilizado para clonagem do fragmento de DNA, contendo a sequência de interesse. A linhagem bacteriana empregada para replicação foi *E. coli* JM 109. Este vetor apresenta sítios dos iniciadores M13 *forward* e *reverse* para permitir o sequenciamento ou PCR do fragmento clonado. Os sítios de EcoRI flanqueiam o sítio de inserção do produto de PCR, facilitando a excisão das inserções. Além disso, apresentam resistência a canamicina e ampicilina e a triagem dos transformantes pode ser realizada de acordo com a seleção de colônias azuis e brancas ou PCR.

Figura 6 - Mapa do vetor pCR™ II-TOPO®

Fonte: Thermo - Invitrogen, 2015.

3.3.2 Vetor pET28a® (Novagen™)

Neste estudo, foi utilizado o vetor pET28a (“plasmid for expression by T7 RNA polimerase”) para expressão de proteína heteróloga em *E. coli* de linhagem BL 21 Star™ (DE3) pLysS9 (Figura 7). Este vetor requer uma cepa que seja capaz de produzir a T7 RNA polimerase do bacteriófago sob o controle do promotor lac UV5 e possuem marca de seleção pela resistência aos antibióticos ampicilina ou canamicina. A expressão do gene acontece por indução de IPTG (0,1 A 1 mM), muitas vezes chegando a níveis de super expressão, o que favorece a formação de corpúsculo de inclusão (BELLÃO, 2006; NOVAGEN™, 2005).

Figura 7 - Mapa do vetor pET28a

Fonte: Novagen™, 2015.

Este vetor apresenta a sequência codificadora dos sítios de clivagem das enzimas *Bam* HI e *Hind* III, assim como também para resistência ao antibiótico canamicina.

A expressão da proteína recombinante acoplada a seis resíduos de histidina nas extremidades N e C terminal, facilita a purificação da proteína por técnica de cromatografia de afinidade por metal imobilizado.

3.4 Construção da sequência codificadora para a proteína antiapoptótica

A construção da sequência para expressão da proteína antiapoptótica recombinante de *L. obliqua* foi realizada com cauda de histidina na porção N e C terminal, permitindo sua captura no processo de purificação. A obtenção da sequência codificadora para a proteína antiapoptótica, baseou-se em dados sobre o peso molecular da mesma, presente em Souza et al., 2005 (Figura 8A) e a determinação da sequência de aminoácidos foi obtida através da biblioteca de cDNA construída por Veiga et al., 2005 (Figura 8B).

Figura 8 - (A/B) – Dados para a obtenção da sequência codificadora para a proteína antiapoptótica

A) Análise de SDS-PAGE da hemolinfa de *L. obliqua* e fração obtida por cromatografia de gel filtração, sendo 1: marcador de peso molecular; 2: hemolinfa bruta; 3: fração que exibe atividade antiapoptótica. Fonte: Modificado de Souza et al., 2005. B) Análise de SDS-PAGE da hemolinfa mostrando a separação das proteínas. - PM: marcador de peso molecular. Fonte: Modificado de Veiga et al., 2005.

Fonte: Modificado de Souza et al., 2005; Veiga et al., 2005.

3.5 Oligonucleotídeos iniciadores

3.5.1 Construção dos oligonucleotídeos iniciadores

O par de oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 3) foi desenhado, incluindo nas extremidades sítios para enzimas de restrição suplementares aos do vetor de clonagem, utilizado para permitir a liberação da cauda de histidina, se necessário.

Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação e clonagem da sequência da proteína APLOrEC

Primer	Sequência
APLOrEccenso	GAGGGATCCGGCCATTACGGC
APLOrEcanti - senso	GAGAAGCTTTTATGTTTCGGAAC

Legenda: **Preto**: sequência facilitadora para restrição enzimática, **Vermelho**: sequência codificadora do sítio de restrição, **Azul**: códon de terminação e **Laranja**: sequência de anelamento na proteína.

Fonte: Mazzoni, M.K.F., 2015.

3.5.2 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em vetor pCR™ II-TOPO®

O vetor pCR™ II-TOPO® apresenta na sua sequência o alvo para os oligonucleotídeos iniciadores M13 *Forward* e *Reverse*, como mostra a tabela 4.

Tabela 4 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores M13 *Forward* e *Reverse*

Primer	Sequência
M13 <i>Forward</i>	5'-GTAAAACGACGGCCAG – 3'
M13 <i>Reverse</i>	5'-CAGGAAACAGCTATGAC – 3'

Fonte: Thermo - Invitrogen.

3.5.3 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em vetor pET28a

O vetor pET28a apresenta na sua sequência o alvo para os oligonucleotídeos iniciadores T7 *Promoter* e *Terminator*, como mostra a tabela 5.

Tabela 5 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores T7 *Promoter* e *Terminator*

Primer	Sequência
T7 <i>Promoter</i>	5'-TAATACGACTCACTATAGGG – 3'
T7 <i>Terminator</i>	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG -3'

Fonte: Thermo –Invitrogen.

3.6 Extração de RNA mensageiro (RNAm) e síntese de DNA complementar (cDNA) a partir do tegumento de *L. obliqua*

Após extração da hemolinfa, os tegumentos da lagarta *L. obliqua* foram colocados em criotubos contendo RNA*later*® Tissue Collection: RNA Stabilization Solution (Thermo - Ambion), seguindo as especificações do fabricante. Trata-se de uma solução aquosa que permite o armazenamento de amostras de forma estável para a utilização do RNA *a posteriori* sem ocorrer degradação. Os criotubos foram estocados à -80 °C até o momento do uso para extração de RNAm.

A extração de RNA mensageiro, foi realizada com o kit Dynabeads mRNA direct (Thermo - Invitrogen). Esse método de isolamento, depende do emparelhamento de bases entre a cauda poli A de resíduos na extremidade 3' da maioria dos RNAm e resíduos de oligonucleotídeos covalentemente acoplados à superfície das esferas magnéticas (*Dynabeads*). Para isto, foi preparada uma amostra de Dynabeads oligo (Dt)25 de acordo

com o protocolo do fabricante (1 mg de *beads* retém aproximadamente 2 µg de RNAm). Em seguida, o tegumento de lagarta *L. obliqua* obtido no sexto ínstar de desenvolvimento, foi submetido a lavagens rigorosas com tampão de hibridização, que contém agentes inibidores de RNase. Posteriormente, com o auxílio da placa magnética e a solução de *beads* correspondente, obteve-se o RNAm, o qual foi quantificado por dosagem no fluorímetro Qubit, utilizando o kit Quant-it RNA assay (Thermo - Invitrogen), segundo informações do fabricante.

Para a síntese de cDNA, foi realizada a reação de transcriptase reversa (RT-PCR) com o Kit a SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo - Invitrogen) conforme indicações do fabricante. Para isto, 2 µl de RNAm (300 ng) foi aquecido por 5 minutos a 70 °C para evitar a formação de estruturas secundárias. Foram adicionados 500 ng de Oligo(dT)₁₈ (oligonucleotídeo iniciador), 1 µl de dNTPs (10 mM de cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 1 µl de RNase *out*, que evita a degradação do RNA e água ultrapura autoclavada para volume final de 14 µl. Esta reação foi incubada durante 5 minutos a 65 °C para desnaturar o ácido nucléico, e também para garantir uma boa atividade enzimática. Em seguida, foi adicionado 4 µl de 5 X First Strand Buffer, que é um tampão estabilizador de pH, 1 µl de DTT (0,1M), que é um reagente redox usado para reduzir as pontes dissulfeto de proteínas antes da eletroforese e também para desproteger o DNA tiolado, já que os átomos de enxofre terminais do DNA tiolado formam dímeros quando em solução, e 1 µl de SuperScript™ III RT (200 unidades/µl), que é a enzima responsável pela síntese do primeiro domínio de cDNA em temperaturas acima de 55 °C, permitindo uma maior especificidade e rendimento elevado de cDNA. Essa mistura foi submetida a uma nova incubação a 50 °C durante 1 hora, com posterior inativação da reação a 70 °C durante 15 minutos.

3.7 Amplificação da sequência de interesse

A amplificação da sequência do cDNA da proteína antiapoptótica foi realizada por reação da cadeia da polimerase (PCR), utilizando a Taq Platinum Brazilian (Thermo - Invitrogen), conforme especificações do fabricante. Para isto, 1 µl de cDNA gerado (600 ng/µl) foi adicionado à reação, contendo 0,2 µl de Taq; 2,5 µl de tampão; 0,75 µl de MgCl₂ e 1 µl de cada oligonucleotídeos iniciadores APLOrEc *senso* e *anti – senso* (Tabela 3), para um volume final de 25 µl de reação, completado com água ultrapura.

As reações foram colocadas no termociclador, dando início a sequência de ciclos da PCR. A temperatura foi programada para atingir 94 °C para que ocorra a dissociação da dupla fita de DNA, logo, a temperatura foi abaixada para 55 °C permitindo o anelamento dos iniciadores às suas sequências específicas correspondentes, em seguida a temperatura foi elevada a 72 °C, permitindo a atividade ótima da enzima Taq polimerase (*Thermus aquaticus*), finalizando assim, o primeiro ciclo. Este ciclo é repetido por aproximadamente 40 vezes de forma idêntica.

As amostras foram visualizadas em gel de agarose 1,5%, usando marcador de pares de base 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo - Invitrogen).

3.8 Clonagem das sequências de interesse em vetor pCR™ II-TOPO®

Como se trata de um material de difícil obtenção por ter ocorrência sazonal e estar disponível somente quando enviada das localidades de coleta, como relatado na introdução, optou-se por fazer a clonagem de todas as sequências amplificadas obtidas. Foi utilizado o Kit pCR®2.1-TOPO® (TOPO TA Clonig Kit® - Thermo - Invitrogen Carlsbad, CA), conforme instruções do fabricante.

3.8.1 Purificação dos fragmentos obtidos por PCR e dosagem dos mesmos

Os produtos de PCR que foram utilizados na clonagem em vetor pCR II-TOPO, foram purificados por precipitação de DNA com etanol. Para isto, em 50 µl de amostra de DNA, condicionada em microtubos, foi adicionado 5 µl de acetato de sódio 3M (10% do volume do amplificado) e 150 µl de etanol 100% gelado (referente a 3 X o volume do amplificado). As amostras foram homogeneizadas por inversão e logo, foram mantidas em ultra freezer -80 °C durante 1 hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4 °C, durante 10 minutos e o etanol foi desprezado. Foi adicionado 100 µl de etanol 70% gelado, homogeneizado por inversão e novamente centrifugado a 14.000 rpm, a 4 °C, durante 10 minutos. Após centrifugação, o etanol foi desprezado e o tubo secou em temperatura ambiente. Então, o DNA presente no microtubo foi ressuspensionado por pipetagem, utilizando 20 µl de água ultrapura autoclavada.

Após purificação, 2 µl de cada amostra de DNA purificado foi quantificada em espectrofotômetro NanoDrop® ND- 1000. A leitura foi realizada em 260 e 280 nm, calculando-se a concentração em ng/µl (multiplicação do valor da absorbância pelo coeficiente de extinção). A pureza do DNA obtido foi calculada a partir da razão A260/A280.

3.8.2 Reação de ligação dos insertos ao vetor pCR™ II-TOPO®

Para a ligação do inserto ao vetor pCR II-TOPO, foram realizadas reações, seguindo especificações do fabricante, utilizando uma razão molar de 3:1 (inserto/vetor), conforme a equação da figura 9, sendo necessário 6 µl de vetor (8,5 ng/µL), 1 µl de inserto (15,8 ng/µl), adicionados à 1 µl de enzima T4 DNA ligase (1 U/µl) (Thermo - Invitrogen), 4 µl de 10 X DNA Ligase Reaction (tampão) e água ultrapura autoclavada, quantidade suficiente para 20 µl de reação. Essas reações foram incubadas por 16 horas a 16 °C e posteriormente, visualizadas por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

$$\frac{50,0 \text{ ng do vetor} \times \text{tamanho do inserto (Kb)}}{\text{tamanho do vetor (Kb)}} \times \text{RAZÃO MOLAR} \frac{\text{inserto}}{\text{vetor}} = \text{ng do inserto}$$

Figura 9 - Equação do cálculo de razão molar entre inserto e vetor

Fonte: Adaptado de (SAMBROOK; RUSSELL., 2001).

3.8.3 Preparação de bactérias quimiocompetentes

As duas linhagens bacterianas utilizadas, JM 109 para clonagem e BL 21 Star™ (DE3) pLysS para a expressão da proteína de interesse, foram quimicamente tratadas para receber um gene exógeno. Para isto, foi preparado um inóculo de cada bactéria separadamente, os quais foram semeados em 250 ml de meio líquido LB a 37 °C sob agitação, até a cultura atingir (DO) com leitura a 600 nm de 0,6. As culturas foram incubadas em gelo por 10 minutos, e posteriormente centrifugadas por 10 minutos, a 15 °C. Após centrifugação, os meios de cultura foram descartados e os sedimentos foram ressuspensos em 5 ml de CaCl₂ 50 mM gelado. Uma última centrifugação foi feita por 10 minutos a 4 °C, 1600 g e os sedimentos foram ressuspensos com 1 ml de CaCl₂ 50 mM gelado e adicionado à eles 20% de glicerol para serem congeladas. As soluções de bactérias quimiocompetentes de

linhagem JM109 e BL 21 Star™ (DE3) pLysS foram aliquotadas (100 µl/tubo) e mantidas em ultra freezer -80 °C, até o momento do uso, sendo denominadas JMQC e BLQC, respectivamente.

3.8.4 Transformação do plasmídeo recombinante em bactérias JMQC

Um volume de 10 µl proveniente da ligação inserto em vetor de clonagem pCR™ II-TOPO®, foi adicionado a uma alíquota de bactéria JMQC e mantido no gelo por 30 minutos. Logo, a bactéria passou por choque térmico, permanecendo a 42 °C por 1 minuto e sendo recolocada no gelo por mais 2 minutos. Foram adicionados 200 µl de SOC *Medium* (meio enriquecido de glicose) e logo, a bactéria foi incubada a 37 °C, a 250 rpm, durante 1 hora. A mistura foi plaqueada em meio seletivo LB – ágar (Luria Bertani) contendo o antibiótico canamicina (50 µg/ml de meio), o indutor de expressão, o IPTG (40 µg/ml) e o substrato, o X-gal (100 µg/ml). As placas foram mantidas em estufa a 37 °C por 24 horas para o crescimento das colônias.

3.8.5 Análise dos transformantes e triagem por PCR

Após crescimento bacteriano, colônias de transformantes (pCR II-TOPO-inserto) foram selecionadas para triagem inicial quanto à presença de clones positivos (colônias brancas) e semeadas em 150 µl de meio LB, contendo canamicina (50 µl/ml), onde ficaram a 37 °C, durante 24 horas sem agitação.

Após 24 horas, 40 µl do meio de cultura de cada transformante foram centrifugados e o pellet obtido foi ressuscitado em 10 µl de água ultrapura para ser utilizado na reação como amostra. A PCR para triagem dos transformantes foi realizada utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores M13 *Forward* e *Reverse* (Tabela 4) e também a enzima *Taq Platinum Brazilian*, conforme especificações do fabricante. As reações foram realizadas em placas de 96 poços de PCR e incubadas em termociclador Mastercycler® Gradiente Eppendorff, com programação inicial de 94 °C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos, seguido de 50 °C durante 90 segundos e aumento da temperatura para 72 °C durante 5 minutos, finalizando com uma extensão final com a mesma temperatura durante 10

minutos. Posteriormente, as reações foram visualizadas por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

3.8.6 Extração de DNA plasmidial e dosagem

Após visualização em gel de agarose, a banda correspondente ao inserto, de aproximadamente 500 pb , foi recortada do gel e purificada com o Kit MinElute® Gel Extraction (QIAGEN®), conforme especificações do fabricante.

Cada amostra purificada foi quantificada em Espectrofotômetro (NanoDrop® ND – 1000, Thermo), utilizando um volume de 2 µl, lidas a 280 nm, sendo a concentração expressa em ng/µl.

3.8.7 Sequenciamento dos clones em vetor pCR™ II-TOPO®

Para a confirmação da clonagem do inserto no vetor de interesse, uma alíquota dos plasmídeos extraídos contendo 300 ng de DNA foi utilizada em reações de sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores M13 *Forward* e *Reverse* (Tabela 4). O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano, em sequenciador automático ABI 3100™ DNA sequencer (Thermo - Life Technologies), com o Kit BigDye™, seguindo protocolo do fabricante.

3.9 Subclonagem da sequência de interesse em vetor de expressão pET28a

Todas as sequências clonadas em vetor pCR II-TOPO foram subclonadas em vetor de expressão pET28a, para a produção da proteína recombinante e purificação da mesma.

3.9.1 Purificação e dosagem do vetor pET28a e da sequência clonada

Os plasmídeos contendo a sequência da proteína antiapoptótica, assim como o vetor pET28a, foram digeridos com a enzima EcoRI. Após digestão, com liberação de inserto e vetor aberto, os mesmos foram purificados utilizando o Kit GFX DNA e Gel “Band

Purification” (GE Healthcare™), conforme instruções do fabricante. Em seguida, inserto e vetor foram quantificados, conforme descrito no item 3.9.1.

3.9.2 Reação de ligação dos insertos ao vetor de expressão pET 28a

Para a ligação do inserto ao vetor pET 28a, foram realizadas as reações, seguindo a equação do item 3.8.2, com uma razão molar 3:1 (inserto/vetor), utilizando a enzima T4 DNA ligase (Thermo - Invitrogen), para um volume final de 20 µl de reação, sendo incubada por 16 horas a 16 °C e posteriormente, visualizadas por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

3.9.3 Transformação dos clones recombinantes em bactérias BLQC

Após confirmação das construções em vetor de expressão, os clones recombinantes foram transformados em *E. coli* cepa BL 21 Star™ (DE3) pLysS quimiocompetente. Este tipo de hospedeiro apresenta um alto desempenho na expressão de proteínas. Para a transformação, um volume de 6 µl de DNA plasmidial dos clones recombinantes (20 ng) foi adicionado a 50 µl de bactérias BLQC e incubadas no gelo por 30 minutos, com um posterior choque térmico por a 42 °C por 2 minutos. Após 2 minutos no gelo, foi adicionado 400 µl de SOC *Medium* e esta mistura foi incubada a 37 °C, a 250 rpm durante 1 hora. Após o período de incubação, a cultura foi plaqueada em meio LB-Ágar contendo canamicina (50 µg/ml de meio), IPTG (40 µg/ml), cloranfenicol (10 µg/ml) e ficaram mantidas em estufas durante 24 horas para o crescimento das colônias.

3.9.4 Análise dos transformantes e triagem por PCR

Para a confirmação dos clones, as colônias brancas dos transformantes foram selecionadas e semeadas em 150 µl de meio LB com canamicina (50 µg/ml) e cloranfenicol (10 µg/ml), em microplaca de 96 poços de PCR, durante 24 horas, a 37 °C e sem agitação. Uma reação de PCR foi realizada, utilizando como amostra 5 µl do meio de cultura de cada transformante, juntamente ao par de oligonucleotídeos iniciadores T7 *Promoter* e T7 *Terminator* (Tabela 5) e a *Taq Platinum Brazilian*, conforme especificações do fabricante. As

reações foram incubadas no termociclador Mastercycler® Gradiente Eppendorff para posterior visualização por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

3.9.5 Sequenciamento dos clones em vetor pET28a

Para a confirmação da clonagem do inserto e de sua orientação no vetor de interesse, clones positivos foram selecionados e submetidos à reação de sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger, no Centro de Estudos do Genoma Humano, em sequenciador automático ABI 3100™ DNA sequencer (Thermo - Life Technologies), com o Kit BigDye™, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores T7*Promoter* e T7 *Terminator* (Tabela 5). Esta metodologia permite determinar a sequência exata de uma cadeia de DNA com até 500 nucleotídeos e consiste na síntese de cadeias a partir do fragmento de DNA a ser sequenciado. Inicialmente ocorre a desnaturação do fragmento de DNA de dupla cadeia, originando cadeias molde para a síntese *in vitro* de DNA. Então, os oligonucleotídeos iniciadores T7 ("*primers*") dão continuidade à reação iniciada pela enzima DNA polimerase. Nesta técnica, além de dNTPs (desoxirribonucleosídeos trifosfatados), usa-se também ddNTPs (didesoxirribonucleosídeos trifosfatados), em baixa concentração, os quais são incorporados aleatoriamente em cada reação na posição do dNTP correspondente, provocando o término da polimerização e dando origem a uma cadeia truncada. Os ddNTPs não apresentam o grupo 3'-OH, e assim, não permitem a formação de uma ligação fosfodiéster com outro nucleotídeo trifosfato, embora possam ser usados pela DNA polimerase. Cada tipo de ddNTP é radioativamente marcado com cores diferentes, permitindo a distinção das cadeias truncadas pela respectiva fluorescência a serem analisadas por eletroforese e diferenciadas entre si por um nucleotídeo.

Para a realização deste sequenciamento, os clones positivos foram inoculados em 10 ml de meio LB contendo canamicina (50 µg/ml) a 37 °C, 200 rpm, *overnight*, para a extração do DNA plasmidial. Foram utilizados 8 ml do inóculo com os clones para o Kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System – Promega (Promega do Brasil, São Paulo, S.P., Brasil), de acordo com o protocolo do fabricante. Os 2 ml restantes foram armazenados com 20% glicerol (v/v) em freezer a -80 °C.

3.10 Indução da expressão da proteína antiapoptótica e análise por eletroforese em gel poliacrilamida SDS-PAGE

Primeiramente, foi preparado um pré-inóculo de meio LB, contendo uma alíquota de 10 µl do clone transformado em bactéria *E. coli* cepa BL 21 Star™ (DE3) pLysS quimiocompetente, canamicina (50 µg/ml) e cloranfenicol (10 µg/ml) para o escalonamento do cultivo e posterior incubação a 37 °C sob agitação de 250 rpm durante 18 horas. Logo, em um erlenmeyer contendo 100 ml de meio LB, foi adicionado canamicina (50 µg/ml) e 1% de pré-inóculo (v/v) para incubação a 37 °C sob agitação de 250 rpm. A densidade óptica (DO) foi monitorada a 600 nm, até que as culturas estejam em torno da metade da fase exponencial de crescimento bacteriano com uma DO de aproximadamente 0,6 a 0,8. Após atingir a DO, uma alíquota de 4 ml foi retirada do frasco, como amostra com tempo de indução zero e em seguida, foi adicionado IPTG 1 mM estéril na cultura, como indutor de expressão, e o cultivo prosseguiu incubado sob agitação a 37 °C. Após adição do IPTG, alíquotas de 4 ml foram retiradas do erlenmeyer a cada 1 hora para controle de rendimento de indução através de espectrofotometria, até serem completadas 4 horas de indução. Em seguida, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 4 °C durante 10 minutos a 1100 g e os pellets e seus respectivos sobrenadantes foram armazenados em -80 °C até o uso.

Para definir o melhor tempo de indução, os pellets correspondentes às alíquotas das induções referentes aos tempos de 0 a 4 horas de indução foram ressuspensos em 100 µl de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0, sendo posteriormente analisados em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%, assim como seus respectivos sobrenadantes. Um volume de 40 µl de cada amostra foi diluído em uma solução contendo β – mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 2% e glicerol 10%, e as soluções foram aquecidas a 100 °C durante 5 minutos. Foi preparado um gel de corrida de poliacrilamida a 15% (5,0 ml de solução de poliacrilamida: 30% bis-acrilamida 0,8%); 2,5 ml de tampão Tris 1,5 M (pH 8,8); 0,1 ml de SDS (Sigma) 10%; 0,1 ml de persulfato de amônia 10%; 0,004 ml de Temed (Merck) e 2,3 ml de água ultrapura).

O gel de empilhamento foi preparado a uma concentração de 4% (1 ml de solução de poliacrilamida (acrilamida 30% bis acrilamida 0,8%), 0,75 ml de tampão Tris-HCl 1,5 M (pH 6,8), 0,06 ml de SDS (Sigma) 10%, 0,06 ml de persulfato de amônia 10%, 0,006 ml de Temed (Merck) e 4,1 ml de água ultrapura. Após o preparo de ambos os géis mencionados acima, 20

μl de cada amostra foi aplicado no gel, para posterior corrida a 120 V, 60 mA, 15 W, em temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas e meia em tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 3,5 mM).

3.10.1 Lise bacteriana

Os pellets obtidos da centrifugação das culturas bacteriana após indução, foram ressuspendidos em fosfato de sódio 20 mM pH 7,0.

As células foram lisadas utilizando um sonicador e mantidas em banho de gelo, realizado durante 20 minutos, sendo 1 minuto com pulsos de 5 segundos, intervalados por 1 minuto em uma intensidade de 40%. Em seguida, foram centrifugados a 1100 g durante 20 minutos a 4 °C, sendo os sobrenadantes armazenados em freezer – 20 °C e denominados sobrenadantes de primeira lavagem. O pellet foi incubado com tampão de lavagem Dynabeads (fosfato de sódio 20 mM pH 7,0, NaCl 300 mM e uréia 4M) e mantido sob agitação por inversão a 4 °C durante 18 horas. Em seguida, foi centrifugado a 1100 g durante 20 minutos e então, sobrenadante e pellet foram armazenados em freezer – 20 °C, sendo o sobrenadante denominado de segunda lavagem.

3.10.2 Gradiente de uréia

A solubilização da fração insolúvel foi realizada por desnaturação dos corpúsculos de inclusão com uréia (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Para isto, foi adicionado às amostras, tampões com diferentes concentrações de uréia, desde a ausência total até a concentração de 8M, variando a concentração dos tampões em 1M a cada ponto. Em seguida, as amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida 15%, onde se utilizou: A) gel de separação: 2,3 ml de água ultrapura; 1,5 ml de Tris pH 8,8; 100 μl de SDS 10%; 100 μl de persulfato de amônio 10%; 5 ml de acrilamida / bis 30% e por fim, 4 μl de Temed. B) gel de empilhamento: 2,05 ml de água ultrapura; 500 μl de acrilamida/ bis 30%; 375 μl de Tris pH 6,8; 30 μl de SDS 10%; 30 μl de persulfato de amônio 10% e 3 μl de Temed. Para a preparação das amostras, foi adicionado 20 μl de tampão de amostra para cada 40 μl de amostra. Como padrão, foi

utilizado 5 µl de Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Promega) e a corrida foi realizada sob os seguintes parâmetros: voltagem 120 V e amperagem 30 mA.

3.10.3 Purificação da proteína recombinante

Para a purificação da proteína recombinante, utilizou-se o Kit Dynabeads His-Tag Isolation & Pulldown, que consiste em um método de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) (Porath, 1975), que utiliza beads magnéticas revestidas de cobalto, as quais apresentam afinidade pelos resíduos de histidina inseridos nas porções N e C terminal.

Aos sobrenadantes da primeira lavagem, foi adicionado tampão de lavagem Dynabeads (fosfato de sódio 20 mM pH 7,0, NaCl 300 mM e uréia 4M) na proporção 1:1, atingindo portanto, as mesmas condições dos sobrenadantes da segunda lavagem, os quais já estavam em tampão de lavagem. Logo, em microtubos de 2 ml, foi feita uma mistura de 50 µl da solução de beads magnéticas (200 µg) em 1 ml de amostra, que permaneceram a -4 °C, sob agitação por inversão, durante 1 hora.

Em seguida, as beads foram isoladas do restante do material contido no microtubo, através de uma estante magnética. Para isto, lavagens sucessivas foram realizadas com o tampão de lavagem Dynabeads, segundo protocolo do fabricante. As proteínas de interesse foram obtidas com um tampão de eluição (fosfato de sódio 0,5M pH 8,0, NaCl 300 mM e uréia 4M).

3.10.4 Diálise da proteína purificada

A proteína purificada foi submetida à diálise. Para isto, 600 µl da proteína recombinante foram colocadas em uma membrana de diálise, que ficou submersa em um béquer contendo um litro de água ultrapura durante 12 horas, sob constante agitação e refrigeração. A água foi trocada a cada 3 horas.

3.10.5 Dosagem da proteína recombinante

A concentração de proteína recombinante obtida foi obtida pelo método Bradford (1976), com o Kit Coomassie Plus™ (Bradford) Assay (Thermo) em microplaca de 96 poços.

Para isto, foi utilizado como padrão, soluções do Kit de albumina sérica de 2 mg/ml, preparados em diluições seriadas nas seguintes concentrações: 0 µl/ml (branco); 2,5 µl/ml; 5 µl/ml; 10 µl/ml; 15 µl/ml; 20 µl/ml e 25 µl/ml.

Em uma microplaca, foi pipetado em cada escavação, 150 µl de cada padrão diluído nas concentrações mencionadas, assim como a amostra e em seguida, para cada reação, foi adicionado 150 µl do reagente Coomassie Plus. Esta microplaca foi submetida à agitação por 30 segundos em um agitador orbital e logo, mantida em temperatura ambiente por 10 minutos sem agitação para posterior leitura com absorbância a 595 nm. Foi determinada uma curva de calibração e o resultado das amostras foi comparado com a curva, indicando assim, a concentração de proteína em µg/ml.

3.10.6 Detecção da proteína antiapoptótica recombinante por anticorpo anti-histidina

Com a finalidade de identificar e caracterizar a proteína antiapoptótica recombinante, o lisado bruto bacteriano e a proteína purificada foram aplicados em um gel de eletroforese SDS-PAGE 15%, conforme descrito no item 3.10. Posteriormente, o gel foi submetido a um processo de transferência das amostras para uma membrana de nitrocelulose (Western Blot), utilizando um tampão de transferência 1 X, mantido sob refrigeração e utilizando os parâmetros: amperagem 350 mA, potência 50 W, por aproximadamente 1 hora. Para confirmar a eficiência da transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau 0,5% (m/v) em ácido acético 0,1% (v/v), enquanto o gel de poliacrilamida foi corado com solução de Coomassie Blue R-250 (Sigma) 0,25%, dissolvido em 50% de isopropanol e 10% de ácido acético.

A membrana foi sutilmente lavada com água ultrapura e então, bloqueada por 2 horas em solução de PBS 1 X, suplementada com leite desnatado 10% (m/v) e 0,05% de Tween™ 20. Logo, foram feitas três lavagens de 5 minutos com PBS 1 X acrescido de 0,05% de Tween™ 20 0,1% (PBST). Então, a membrana foi incubada em solução de PBS 1 X, contendo leite desnatado 10%; 0,05% de Tween™ 20 e o anticorpo primário anti-histidina (Anti-His Antibody – GE Healthcare), na proporção 1:3000, em temperatura ambiente, com leve agitação em plataforma agitadora, durante 1 hora. Novamente, foram feitas três lavagens de 5 minutos com PBST, para posterior incubação em solução de PBS 1 X, contendo leite desnatado 10%; 0,05% de Tween™ 20 e o anticorpo secundário anti Ig G (camundongo)

conjugado com HRP (Horseradish Peroxidase) GE Healthcare, na proporção 1: 10000, mantido durante 1 hora, nas mesmas condições da primeira incubação. Foram feitas as três últimas lavagens de 5 minutos com PBST e então, a membrana foi analisada em relação às bandas marcadas com os anticorpos.

3.11 Análises de apoptose celular

3.11.1 Determinação do efeito protetor da APLOrEC purificada e da hemolinfa bruta células VERO

Para avaliar a capacidade protetora da proteína antiapoptótica de *L. obliqua* (APLOrEC) purificada, assim como o efeito hemolinfa bruta, ambas foram analisadas frente a indutores químicos de apoptose. Células VERO foram cultivadas de acordo com o item 3.2.2. Após semi confluência, as células foram tripsinizadas (enzima Tripsina – GIBCO) durante 2 minutos e então plaqueadas, em microplaca de 96 cavidades (TPP) contendo 2×10^5 células. Após um dia de crescimento e aderência das células, o meio de cultivo foi previamente tratado com APLOrEC (0,5 µg/ml) e com a hemolinfa total (HB) 2,5% (v/v). Após 1 hora de contato das células com a APLOrEC e a hemolinfa bruta, foi adicionado peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e Tert- butyl hydrogen peroxide (T-BHP) como indutores químicos de estresse oxidativo, em diferentes diluições razão 5 (500; 100; 20; 4; 0,8; 0,16; 0,032 e 0,0064 mM), conforme a figura 10.

O efeito protetor antiapoptótico foi determinado em microscópio ótico invertido Nikon TS 100 após 24 horas do contato das células com os indutores de apoptose. Após visualização no microscópio ótico, o meio de cultivo contido na placa foi retirado, e as células em todas as escavações foram coradas com cristal de violeta. Após 5 minutos, a placa foi sutilmente lavada com água ultrapura para ser novamente analisada em microscópio. Este é um método colorimétrico que consiste em verificar a densidade celular pela coloração do DNA, obtendo informação quantitativa sobre a densidade relativa de células vivas aderidas em placas de cultura.

	1	T-BHP				2	3	4	5	H ₂ O ₂				8	9	10	11	12	
A		500 mM								500 Mm									APLOR _{EC}
B		100 mM								100 mM									
C		20 mM								20 mM									
D		4 mM								4 mM									
E		0,8 mM								0,8 mM									HB
F		0,16mM								0,16 mM									
G		0,032 mM								0,032 mM									
H		0,0064 mM								0,0064 mM									

Figura 10 - Esquema da microplaca de 96 poços contendo células VERO mostrando o teste de atividade biológica da APLO_{REC} e da HB, desafiadas com indutores químicos de apoptose (T-BHP e H₂O₂).

Poços 1F, 1G e 1H da coluna 1: controle de células VERO; coluna 2: células VERO com indutor de apoptose T-BHP em diferentes diluições (razão 5); colunas 3 e 4: células VERO previamente tratadas com APLO_{REC} (0,5 µg/ml) e desafiadas com T-BHP, seguindo as mesmas diluições da coluna 2; colunas 5 e 6: células VERO previamente tratadas com HB 2,5% (v/v) e desafiadas com T-BHP, seguindo as mesmas diluições da coluna 2; coluna 7: células VERO com indutor de apoptose H₂O₂ em diferentes diluições (razão 5); colunas 8 e 9: células VERO previamente tratadas com APLO_{REC} (0,5 µg/ml) e desafiadas com H₂O₂, seguindo as mesmas diluições da coluna 7; colunas 10 e 11: células VERO previamente tratadas com HB 2,5% (v/v) e desafiadas com H₂O₂, seguindo as mesmas diluições da fileira 7; coluna 12: controle das amostras, APLO_{REC} 0,5 µg/ml (poços 12A- 12D) e HB 2,5% v/v (poços 12E- 12H). Fonte: Mazzoni, M. K. F., 2015.

3.11.2 Determinação da alteração do citoesqueleto de células VERO por microscópio confocal a laser LSM 510 META (Zeiss) e de L929 por microscópio de fluorescência (AXIO VERT. A1) após indução de apoptose e efeito da APLO_{REC} na manutenção desta estrutura

O efeito da APLO_{REC} na manutenção do citoesqueleto foi determinado após indução de morte celular por H₂O₂. Para isto, células VERO e células L929, foram cultivadas de acordo com o item 3.1.1. Quando o cultivo estava semi confluyente, as células foram tripsinizadas (enzima Tripsina – GIBCO) durante 2 minutos e então plaqueadas por poço em lamínulas circulares em placa de 24 poços (TPP) para células VERO e diretamente em placas de 96 poços para células L929. Após um dia de crescimento e aderência celular, as células foram tratadas com 0,5 µg/ml de APLO_{REC} durante 1 hora. Em seguida, foi adicionado H₂O₂ para induzir a morte por apoptose, em diferentes diluições, razão 5 (100, 20, 4, 0,8, 0,16 e 0,032 mM).

Após 24 horas de contato, o meio foi retirado, e cada poço foi lavado duas vezes com PBS. Em seguida, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% diluído em PBS durante 20 minutos. A solução fixadora foi retirada, e os poços foram lavados três vezes com PBS para posterior permeabilização com Triton X-100 0,1% diluído em PBS durante 15 minutos. Foi adicionado em cada poço, 50 µl de uma solução bloqueio de BSA 1%, contendo RNase (20 mg/ml) e a microplaca ficou em estufa, a 37 °C durante 1 hora. Logo, retirou-se a solução bloqueadora e foi adicionado uma solução de PBS contendo BSA 1% e faloidina conjugada com FITC (2 µg/ml), na proporção 1:50, durante 2 horas. Após o período de incubação, a solução foi retirada, os poços foram lavados três vezes com PBS e em seguida incubados com solução de PBS contendo iodeto de propídio (20 µg/ml) e permaneceram no escuro durante 1 hora. Por último, foram realizadas três lavagens com PBS. As lamínulas de células VERO foram retiradas da microplaca e montadas em lâminas, contendo Fluormount Aqueous Mounting Medium (Sigma) para posterior visualização em microscópio confocal e a placa de células L929 foi visualizada diretamente na placa em microscópio de fluorescência.

Em ambas as placas aplicadas a este experimento, foram utilizadas quatro colunas do total, sendo: uma para controle de células, uma segunda para análise do efeito de morte celular provocado pela adição de H₂O₂ em diferentes diluições (razão 5) e as duas últimas para observação do efeito protetor de 0,5 µg/ml de APLOrEC em células com morte induzida por H₂O₂.

3.12 Análises de bioinformática

A sequência da proteína recombinante antiapoptótica foi analisada por bioinformática utilizando (NCBI Blast: protein sequence 2.2.30) quanto à presença de possíveis glicosilações, assim como dos domínios conservados.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da sequência da proteína recombinante antiapoptótica de *L. obliqua*

De acordo com a sequência da proteína antiapoptótica de *Lonomia obliqua*, obtida da biblioteca genômica, cedida pela Dra. Ana Beatriz Gorini da Veiga (UFCSA-RS), foi simulada a construção da APLOrEC em vetor pET28a (Figura 11), com cauda de histidina na porção N e C terminal, gerando uma proteína com 187 aminoácidos, de peso molecular de aproximadamente 21 KDa.

Os alinhamentos significativos produzidos pela sequência da proteína, analisados por bioinformática, demonstraram que 90% desta sequência se identifica com uma proteína hipotética de *Lonomia obliqua* com número de acesso no GenBank AY829823.1.

Sequência *	AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTC CCCTCTAGAAATAATTTTGTCTTAACCTTAAGAAGGAGATATACCATGGCAGCAGCATCATCA TCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGCGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAG CAAATGGGTGCGGGATCCAAAATCAATCCCGGCCAGAATAAGATTG TCCGCAATTCACGAATTCCTAATCTTCAAAGAAGATTCTCAACCAATGACTGAAGTCTGAA GATGTTGGACGAGGGTGTGATTCCACACGACATGTCCGAAGACTACAGCTACTTGCCAAAGAGG TTAATGTTGCCTAGAGGTACTGAAGGTGGTTTCCATTCCAGTTCTTCGTCTTTGTCTATCCAT TTGAATCAAGCACAAAGAAGCTTGACACCTTTTCGAGGCTTTCATGATTGACAACAAGCCTCTTGG CTATCCATTTCGACCGTCCAGTCTGAGTCTCTCTTCAAACAGCCCAACATGTACTTCAAGGAT GTCTTAGTATATCATGAAGGTGAATACAACCCGTACAAGCTCAATGTTCTAGTTACTTCACTC ACTCCAATAAAAGAGCTTGCAGGCGGCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCT GAGATCCGGCTGCTAACAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATA ACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG
Tradução teórica 5'-3'	MetGSSHHHHHSSGLVPRGSHMetASMetTGGQQMetGRGSMetDWFTHKINPGQN KIVRNSNEFLIFKEDSQPMetTELLKMetLDEGVIPHDMetSEDYSYLPKRLMetLPR GTEGGFPFQFFVFPFESSTKNLTPFEAFMetIDNKPLGYFPDRPVVESLQPNMe tYFKDVLVYHEGEYNPYKLNVPSTHNSKVPKHStopACGRTR

Figura 11 - Sequência teórica da APLOrEC/ pET28a.

Códon de partida, Cauda de histidina, Sítio Bam HI, Iniciadores sense e anti sense respectivamente, Extremidade coesiva, Sítio Hind III. Fonte: Mazzoni, M.K.F., 2015.

4.1.1 Amplificação da sequência da proteína de interesse

A extração do RNAm foi bem sucedida, e foi utilizado como molde para a síntese de cDNA. Para a amplificação da sequência da proteína, foram realizadas reações de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores APLOrEC *senso* e *anti-senso* (Tabela 3). A

* Número de acesso GenBank Proteína antiapoptótica (AY829823.1)

amplificação gerou uma banda de aproximadamente 500 pb (Figura 12). As amostras foram visualizadas em gel de agarose 1,5% em cuba horizontal.

Figura 12 - Gel de agarose 1,5% mostrando a amplificação do fragmento de interesse obtido por PCR a partir do cDNA.

1 – marcador de pares de base 1KB Plus DNA Ladder (Thermo - Invitrogen); 2, 3 e 4 - amplificação do inserto (500 pb). Fonte: Mazzoni, M.K.F., 2015.

4.2 Clonagem das sequências de interesse em vetor pCR™ II-TOPO®

Inicialmente, as sequências de interesse obtidas por PCR eo vetor de clonagem utilizado foram digeridos, utilizando enzimas de restrição *Hind* III e *Bam* HI, clivando-os em regiões específicas.

4.2.1 Transformação do plasmídeo recombinante em bactérias JMQC

Os produtos da reação de ligação (sequência + vetor de clonagem) foram transformados em bactérias *E. coli* JM109, previamente processadas para se tornarem quimiocompetente e analisadas quanto à obtenção de colônias após plaqueamento em meio seletivo LB – ágar.

4.2.2 Análise dos transformantes em JMQC e triagem por PCR

Das colônias obtidas, foram encontradas colônias brancas e azuis. As colônias brancas são um indicativo de que os clones apresentam o gene de interesse, uma vez que a interrupção da expressão do gene β -galactosidase em meio com o indutor de expressão, o

IPTG (isopropil- β -D-tiogalactoside), impede a degradação do substrato X-Gal, que confere coloração azul as colônias. O IPTG se liga a proteína repressora Lac, a qual é responsável por paralisar a produção de enzimas na ausência de lactose, inativando-o e assim, permite a transcrição das sequências. Foram selecionadas 10 colônias brancas, para triagem por PCR e obteve-se bandas amplificadas com tamanho referente a vetor + inserto.

O DNA plasmidial foi extraído e novamente dosado.

Todas as etapas de clonagem da sequência de interesse em vetor pCR II-TOPO foram bem sucedidas, como se esperava.

4.3 Sequenciamento dos clones em vetor pCR™ II-TOPO®

Os clones recombinantes foram analisados quanto à correta inserção dos insertos no vetor pCR II-TOPO, através do sequenciamento nucleotídico, pelo método de Sanger. Os resultados obtidos pelo sequenciamento foram coerentes com os resultados obtidos por PCR, confirmando a combinação entre insertos e vetores.

4.4 Subclonagem da sequência de interesse em vetor de expressão pET28a

4.4.1 Purificação e dosagem dos plasmídeos recombinantes e do vetor pET28a

Os plasmídeos recombinantes, assim como o vetor pET28a vazio, foram digeridos com a enzima EcoRI e analisados para confirmação da presença dos respectivos fragmentos. Em seguida, as bandas referentes à plasmídeo e vetor foram purificadas por extração do gel de agarose e dosadas.

4.4.2 Reação de ligação dos insertos ao vetor pET28a

O inserto e o vetor, purificados e quantificados, foram adicionados na reação de ligação na proporção 3:1 (inserto/vetor), conforme descrito em materiais e métodos, no tópico 3.9.2. De acordo com a equação, para cada 50 ng de vetor, deve-se utilizar 14 ng de inserto. Portanto, para esta reação de volume final de 20 μ l, foi aplicado um volume de 6 μ l de vetor (8,5 ng/ μ l) e 1 μ l de inserto (15,8 ng/ μ l).

4.4.3 Transformação dos clones recombinantes em bactérias BLQC

Os produtos das reações de ligação em vetor pET28a, assim como o vetor vazio, utilizado como controle, foram transformados em bactéria BLQC e plaqueados em meio seletivo LB – ágar, conforme descrito em materiais e métodos no item 3.9.3. A placa apresentou colônias brancas e a placa controle revelou apenas colônias azuis.

4.4.4 Análise dos transformantes em BLQC e triagem por PCR

Para certificar que as colônias brancas crescidas em microplacas apresentam efetivamente os clones transformantes, estes, foram analisados por PCR.

A reação de PCR demonstrou a amplificação com tamanho referente a inserto/ vetor, como mostra a figura 13.

Figura 13 - Gel de agarose 1,5% para visualização da PCR de triagem dos clones dos transformantes em E. coli BL 21 (DE3) plysS

1- Marcador 1Kb (Fermentas); 2 e 3 – clones negativos , amplificação sem inserto; 4 e 5 – clones positivos de APLOrEC / pET28a, amplificação com tamanho referente a inserto / vetor de aproximadamente 750 bp.

Fonte: Fonte: Mazzoni, M.K.F., 2015.

4.5 Sequenciamento dos clones em vetor pET28a

Os clones selecionados foram analisados quanto à inserção do inserto no vetor pET28a através do sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger.

Os resultados do sequenciamento e da PCR foram compatíveis, comprovando a recombinação entre inserto e vetor pET28a. A figura 14 mostra a sequência de nucleotídeos e dos respectivos aminoácidos da sequência da proteína de interesse.

Sequência de nucleotídeos dos clones	<p>ATGGGCAGCAGC CATCATCATCATCATCAC AGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCA GCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCC ATGCAATGG TCACTCA AAAATCAATCCCGGCCAGAATAAGATTGTCCGCAATTCCAACGAATT CCTAATCTTCAAAGAAGATTCTCAACCAATGACTGAACTGCTAAAGATGTTGGACG AGGGTGTGATTCCACACGACATGTCCGAAGACTACAGCTACTTGCCAAAGAGGTTA ATGTTGCCTAGAGGTACTGAAGGTGGTTTCCCATTCCAGTTCCTTCGTCTTTGTCTA TCCATTTGAATCAAGCACAAAGAACTTGACACCTTTCGAGGCTTTTCATGATTGACA ACAAGCCTCTTGGCTATCCATTCGACCGTCCAGTCGTAGAGTCTCTCTTCAAACAG CCCAACATGTACTTCAAGGATGTCTTAGTATATCATGAAGGTGAATACAACCCGTA CAAGCTCAATGTTCTAGTTACTTCACTCACTCCAATAAA GTTCCGAAACAA AAGC TTGCGGCCGCACTCGAG CACCACCACCACCACCAC TGA</p>
Tradução	<p>MetGSSHHHHHSSGLVPRGSHMetASMetTGGQQMetGRGSMetDWFTHK INPGQNKIVRNSNEFLIFKEDSQPMetTELLKMetLDEGVIPHDMetSEDY SYLPKRLMetLPRGTEGGFPFQFFVFVYPFESSTKNLTPFEAFMetIDNKP LGYPFDRPVVESLFLKQPNMetYFKDVLVYHEGEYNPYKLVPSYFTHSNKV PKHKLAAALEHHHHHHStop</p>

Figura 14 - Resultado do sequenciamento dos três clones positivos de APLOrEC/ pET28a e a provável tradução da proteína expressa.

Sequência Recombinante, sequência do vetor, **Códon de Partida**, **Cauda de Histidina**, **Sítio BamHI**, **Iniciadores sense e anti sense respectivamente**, **Sítio HindIII**, **Códon de Parada**. Fonte: Mazzoni, M.K.F., 2015.

4.6 Indução da expressão da proteína recombinante e análise por eletroforese em gel poliácridamida SDS-PAGE

Foi realizado um teste piloto de indução, em escala e volumes reduzidos, para determinar em quanto tempo pode ser obtido o rendimento máximo de expressão da proteína recombinante.

A figura 15 mostra a análise das amostras por eletroforese em gel de poliácridamida SDS-PAGE 15%, desde o tempo 0 até 4 horas de indução, constatando que a proteína recombinante começa a ser expressada a partir de 2 horas.

Em um segundo gel de SDS-PAGE 15% (Figura 16), as amostras foram analisadas quanto à solubilização da fração insolúvel, onde se encontra a proteína recombinante de interesse. Cinco amostras foram submetidas à eletroforese, sendo: o sobrenadante bruto sem indução, o sobrenadante obtido da primeira lavagem após lise bacteriana (conforme descrito no item 3.10.1), o sobrenadante de primeira lavagem com tampão de lavagem

Dynabeads sem uréia, o sobrenadante com um tampão de lavagem contendo apenas uréia 4M e o sobrenadante obtido da segunda lavagem com o tampão *Dynabeads* e adição de uréia 4M. Este gel indica que a proteína antiapoptótica recombinante é corretamente obtida com o sobrenadante de segunda lavagem, obtido com o tampão *Dynabeads* (fosfato de sódio 20 mM pH 7,0, NaCl 300 mM), com adição de uréia 4M, como mostra a figura 16.

Figura 15 - Gel de poliácridamida 15% das amostras nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 horas de indução em *E. coli* BL 21 Star™ (DE3) pLysS.

M: marcador de peso molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Promega); 1: clone APLOrEC/ pET28a tempo 0 de indução (sem IPTG); 2: clone com 1 hora de indução; 3: clone com 2 horas de indução; 4: clone com 3 horas de indução; 5: clone com 4 horas de indução.

Fonte: Mazzoni, M.K.F., 2015.

Figura 16 - Gel de poliácridamida 15% mostrando sobrenadantes obtidos da indução de expressão em *E. coli* BL 21 Star™ (DE3) pLysS, pré e pós lise bacteriana e com diferentes tampões de lavagem.

M – marcador de peso molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Promega); 1 – sobrenadante bruto sem indução; 2 – sobrenadante de primeira lavagem pós lise bacteriana; 3 – sobrenadante de primeira lavagem com tampão *Dynabeads* sem uréia; 4 – sobrenadante com tampão de lavagem contendo apenas uréia 4M; 5 – sobrenadante obtido da segunda lavagem com o tampão *Dynabeads* e adição de uréia 4M.

Fonte: Mazzoni, M.K.F., 2015.

4.6.1 Gradiente de uréia

Quando se utiliza sistema de expressão em bactérias, a formação de corpúsculos de inclusão é algo esperado e sabe-se que é um produto insolúvel gerado durante a expressão bacteriana, que dificulta a obtenção da proteína em sua correta conformação.

Na tentativa de solubilizar a fração insolúvel obtida, foi realizada uma curva com diferentes gradientes de uréia, que é um inibidor de protease e possui nitrogênio que age intercalando entre os corpúsculos de inclusão, solubilizando a proteína (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

A figura 17 mostra que a solubilização da proteína de aproximadamente 21 KDa, se inicia em 4M.

Figura 17 - Gel de poliacrilamida 15% mostrando a banda referente à APLOrEC/pET28 na curva de gradiente de uréia.

M - marcador de peso molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Promega); 1 – uréia 8M; 2 – uréia 7M; 3- uréia 6M; 4 – uréia 5M; 5 – uréia 4M; 6 – uréia 3M; 7 – uréia 2M; 8 – uréia 1M; 9 – uréia 0M.

Fonte: Mazzoni, M.K.F., 2015.

4.6.2 Purificação da proteína

Após lise bacteriana, o sobrenadante em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 (amostra de lisado total de bactéria após 4 horas de indução), o sobrenadante da primeira lavagem em tampão Dynabeads sem uréia (fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 e NaCl 300 mM) e o sobrenadante da segunda lavagem em tampão Dynabeads (fosfato de sódio 20 mM pH 7,0, NaCl 300 mM e uréia 4M) foram purificados por sistema de beads, como descrito em material e métodos, que consiste em uma técnica de afinidade do cobalto (que reveste as

microesferas) pelos resíduos de histidina acoplados à porção N e C terminal do vetor e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (Figura 18). A purificação das proteínas recombinantes por afinidade utilizando o sistema Dynabeads Histag foi eficiente.

Figura 18 - Gel de poliacrilamida 15% de amostras antes e depois da purificação por Dynabeads Histag. M - marcador de peso molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Promega); 1- poço vazio; 2 e 3 - amostras do lisado total de bactéria; 4 e 5 – sobrenadantes da primeira lavagem em tampão Dynabeads sem uréia; 6- sobrenadante da segunda lavagem em tampão Dynabeads com adição de uréia 4M.

Fonte: Mazzoni, M.K.F., 2015.

4.6.3 Diálise e dosagem da proteína recombinante

Após a purificação, a proteína recombinante purificada foi dialisada para a retirada de uréia. Foi utilizado o método colorimétrico Bradford, determinando aproximadamente 50 µg/mL de proteína.

4.6.4 Western Blot

Através do western blot, realizado com anticorpo anti – his, foi possível detectar a presença da proteína recombinante (Figura 19).

Figura 19 - Western Blot do extrato bruto e da proteína recombinante purificada.

M – marcador de peso molecular; 1 – extrato bruto induzido; 2 – APLOrEC purificada; 3 – Extrato bruto não induzido.

Fonte: Mazzoni, M.K.F., 2015.

4.7 Análises de apoptose celular

4.7.1 Determinação do efeito protetor da APLOrEC purificada e da hemolinfa bruta em células VERO

A capacidade protetora da proteína antiapoptótica de *Lonomia obliqua* recombinante em *E. coli* (APLOrEC), foi avaliada comparativamente com o efeito da hemolinfa bruta de *L. obliqua* (HB) em células VERO.

A figura 20 mostra o efeito da proteína recombinante antiapoptótica e da hemolinfa bruta de *L. obliqua*, em microplaca de 96 poços, desafiadas com indutores químicos de stress oxidativo, o Tert- butyl hydrogen peroxide (T- BHP) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), após serem coradas com cristal de violeta.

Os poços 1F a 1H, representam o controle de células e os poços 12A a 12D e 12E a 12H, representam o controle das amostras APLOrEC (0,5 µg/ml) e HB 2,5% (v/v), respectivamente.

Os poços das colunas 2, 3, 4, 5 e 6 representam o experimento realizado com T-BHP. Nota-se que, tanto a proteína recombinante quanto a hemolinfa bruta demonstraram um efeito protetor irrelevante quando testadas frente ao indutor T-BHP. Este experimento foi repetido por sete vezes consecutivas e os resultados foram reprodutíveis. Por conta disto, optou-se por não utilizar o Tert- butyl hydrogen peroxide nos testes seguintes com cultivos celulares.

Em contrapartida, como pode ser observado nos poços das colunas 7, 8, 9, 10 e 11, a APLOrEC e a HB foram capazes de proteger as células VERO da morte induzida por H_2O_2 . A coluna 7 mostra o efeito provocado por H_2O_2 nas células em diferentes diluições (razão 5), indicando o efeito do indutor até o poço 7E, onde a concentração utilizada foi 0,8 mM. Nos demais poços, com concentrações menores de indutor (0,16 mM; 0,032 mM e 0,0064 mM), não foi observado ação do indutor. Os poços das colunas 8 e 9, realizados em duplicata, indicam a existência de atividade protetora de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de APLOrEC, em concentração de indutor menor que 20 mM. As colunas 10 e 11, também realizada em duplicata, apontam que a HB, utilizada na concentração 2,5% (v/v), foi um excelente protetor de morte celular por apoptose, protegendo as células de concentrações de indutor de até 500 mM (poços 10A e 11A).

Figura 20 - Microplaca de 96 poços mostrando o efeito protetor da APLOrEC (0,5 $\mu\text{g/ml}$) e da HB 2,5% (v/v), em diferentes diluições de T-BHP e H_2O_2 .

coluna 1- controle de células VERO nos poços 1F, 1G e 1H; coluna 2 – diferentes diluições razão 5 de T-BHP em células VERO; colunas 3 e 4 - células VERO previamente tratadas com APLOrEC (0,5 $\mu\text{g/ml}$) e desafiadas com T-BHP, seguindo as mesmas diluições da coluna 2; colunas 5 e 6 - células VERO previamente tratadas com HB 2,5% (v/v) e desafiadas com T-BHP, seguindo as mesmas diluições da coluna 2; coluna 7 – diferentes diluições razão 5 de H_2O_2 em células VERO; colunas 8 e 9 - células VERO previamente tratadas com APLOrEC (0,5 $\mu\text{g/ml}$) e desafiadas com H_2O_2 , seguindo as mesmas diluições da coluna 7; colunas 10 e 11 - células VERO previamente tratadas com HB 2,5% (v/v) e desafiadas com H_2O_2 , seguindo as mesmas diluições da coluna 7; CA - controle das amostras, APLOrEC (poços 12A – 12D) e HB (poços 12E – 12H). A coloração com cristal de violeta foi realizada após 24 horas de indução.

Fonte: Mazzoni, M. K. F., 2015.

4.7.2 Análise microscópica da morte por apoptose em células VERO e determinação da alteração do citoesqueleto e efeito protetor da APLOrEC na manutenção desta estrutura por microscópio confocal e de células L929 por microscópio de flourescência após indução de apoptose

A água oxigenada é um potente indutor de estresse oxidativo, acarretando a morte celular por apoptose. Objetivando estabelecer o efeito protetor da APLOrEC frente a este indutor, células VERO foram tratadas com 0,5 µg/ml de APLOrEC, 1 hora antes da adição de H₂O₂. Após 24 horas, as células foram visualizadas em microscópio óptico invertido com aumento de 40 X.

A figura 21 mostra que 0,5 µg/ml de APLOrEC foi eficiente na proteção das células VERO pela morte induzida por 20 mM e 4 mM de H₂O₂.

Figura 21 - Análise microscópica do efeito protetor da APLOrEC em células VERO com morte induzida 20 e 4 mM de H_2O_2 .

A – Controle de células VERO; B - Célula VERO com morte induzida por H_2O_2 a 20 mM; C – Célula VERO com morte induzida por H_2O_2 a 4 mM; D – Células VERO previamente tratadas com APLOrEC (0,5 $\mu g/ml$) e desafiadas com H_2O_2 a 20 mM; E - Células VERO previamente tratadas com APLOrEC (0,5 $\mu g/ml$) e desafiadas com H_2O_2 a 4 mM.

Fonte: Mazzoni, M. K. F., 2015.

A alteração do citoesqueleto após indução de morte celular por H_2O_2 , e efeito da APLOrEC na manutenção desta estrutura foi observada através da estrutura da rede de actina em microscópio confocal para células VERO e em microscópio de fluorescência para células L929.

A actina é uma proteína presente no citoplasma das células eucariotas sob a forma de feixes de filamentos paralelos que, associada à miosina e moléculas de ATP, são fundamentais na estrutura e manutenção do citoesqueleto. Além dos filamentos de actina, o citoesqueleto também é formado por filamentos intermediários e microtúbulos, responsáveis pela motilidade e divisão celular, transporte de organelas e também na adesão celular.

Assim que o processo de morte por apoptose se inicia, as células perdem os filamentos de actina, tomando um formato arredondado, o que faz com que elas se desprendam do suporte de crescimento, caracterizando as células em início de apoptose.

Na figura 22 é observado o efeito protetor da APLOrEC no citoesqueleto de células VERO, marcadas com FITC – Faloidina (2 µg/ml) e iodeto de propídio e analisadas em microscópio confocal. As fotos mostram as células em estado viável (A e B), após 24 horas de indução de morte celular com 4 mM e 0,8 mM de H₂O₂ (C e D, respectivamente) e após indução de morte e tratadas com APLOrEC (0,5 µg/ml) (E e F). Como pode ser observada, a rede de actina é desestruturada conforme o aumento da concentração do indutor de morte. A H₂O₂ na concentração de 4 mM (C) provocou uma total destruição da rede de actina, enquanto que na concentração 0,8 mM (D), a alteração do citoesqueleto foi parcial. As células induzidas com H₂O₂ e tratadas com APLOrEC (0,5 µg/ml) (E e F), apresentam a rede de actina íntegra, em ambas concentrações utilizadas do indutor, indicando que o efeito protetor da APLOrEC se estende ao citoesqueleto celular, permitindo que a célula se mantenha aderida ao suporte, e portanto, viáveis.

Figura 22 - Análise por microscópio confocal da manutenção do citoesqueleto de células VERO tratadas com APLOrEC (0,5 µg/ml), induzidas por H₂O₂ e marcadas com FITC-Faloidina e iodeto de propídio.

A e B – controle de células VERO; C – células VERO com indutor de morte (4 mM); D – células VERO com indutor de morte (0,8 mM); E- células VERO previamente tratadas com 0,5 µg/ml de APLOrEC e induzidas a morte com 4 mM de H₂O₂; F – células VERO previamente tratadas com 0,5 µg/ml de APLOrEC e induzidas com 0,8 mM de H₂O₂. A marcação foi realizada após 24 horas de indução com H₂O₂.

Fonte: Mazzoni, M. K. F., 2015.

A figura 23 mostra o efeito protetor da APLOrEC no citoesqueleto de células L929 em microscópio de fluorescência. A marcação foi realizada FITC - Faloidina (2 µg/ml) e iodeto de propídio. As fotos mostram as células em estado viável (A), após 24 horas de indução com 4 mM e 0,8 mM de H₂O₂ e tratadas com 0,5 µg/ml de APLOrEC (B e C). Nota-se que os efeitos são similares aos observados em células VERO, onde a destruição da rede de actina é proporcional a concentração do indutor. Como pode ser observado, de acordo com o formato das células e a notória presença dos filamentos de actina, a APLOrEC foi capaz de manter parcialmente a rede de actina, tanto com indutor de apoptose a 4 mM, quanto a 0,8 mM.

Figura 23 - Análise por microscópio de fluorescência da manutenção do citoesqueleto de células L929 tratadas com 0,5 µg/ml de APLOrEC durante 1 hora, induzidas a morte por H₂O₂ durante 24 horas e marcadas com FITC-Faloidina e iodeto de propídio.

A – controle de células L929; B – células L929 previamente tratadas com 0,5 µg/ml de APLOrEC e induzidas com 4 mM de H₂O₂; C – células previamente tratadas com 0,5 µg/ml de APLOrEC e induzidas com 0,8 mM de H₂O₂. As células foram fixadas e marcadas após 24 horas de indução.

Fonte: Mazzoni, M. K. F., 2015.

4.8 Análises de Bioinformática

Por análises de bioinformática (NCBI Blast: protein sequence 2.2.30) da sequência da proteína antiapoptótica, observou-se que esta, apresenta um domínio conservado da superfamília hemocianina C (Figura 24). Hemocianina é uma proteína incolor que contém átomos de cobre em sua composição, que quando combinada com moléculas de oxigênio, se torna azulada. É encontrada na hemolinfa de muitos artrópodes (aracnídeos e crustáceos), cefalópodes (moluscos) e nas larvas dos insetos, exercendo a função de transporte de oxigênio e também como proteína de armazenamento.

Figura 24 - Domínio conservado de hemocianina C presente na sequência da proteína antiapoptótica.
Fonte: NCBI Blast conserved domains, 2015.

Observou-se também que a hemocianina C, representa uma subunidade do precursor arilforina de *Antheraea pernyi*, e também como subunidade beta do precursor arilforina de *Manduca sexta* (GenBank AAA29305.1)(Figura 25). A arilforina é uma proteína sintetizada no corpo gorduroso dos insetos e secretada para a hemolinfa. Normalmente é encontrada na forma hexamérica com subunidades em torno de 80 KDa que apresentam carotenóides (pigmentos oxidáveis) em algumas espécies (RYAN et al., 1985; TELFER; KEIM; LAW, 1983). Esta proteína tem a função de reserva de aminoácidos, os quais são necessários para o desenvolvimento do inseto adulto (KANOST et al., 1990).

Figura 25 - Domínios conservados encontrados em *Manduca sexta*
Fonte: NCBI Blast conserved domains, 2015.

5 DISCUSSÃO

A produção de proteínas recombinantes para fins terapêuticos e biotecnológicos tem se mostrado eficaz tecnológica e economicamente. Os avanços obtidos pela engenharia genética levaram ao desenvolvimento da biotecnologia, com destaque para o desenvolvimento de diversos sistemas de expressão de proteínas recombinantes.

A equipe de nosso laboratório vem realizando estudos referentes à expressão de proteínas recombinantes, utilizando preferencialmente o sistema de expressão em baculovírus/células de inseto, devido às características vantajosas que este sistema de expressão proporciona. Porém, a produção em células de inseto, envolve técnicas mais complexas, com custo e tempos maiores do que a produção em bactérias.

Comparações entre os dois sistemas de expressão só seriam possíveis estudando-se detalhadamente as características da proteína produzida em cada um dos dois sistemas a fim de se avaliar se algum sistema resulta em vantagens que indiquem sua utilização.

Após ficar constatado que a adição da hemolinfa de *L. obliqua* é capaz de prolongar a viabilidade celular de cultivos de células de inseto ou mamífero que sofrem morte por depleção de nutrientes ou por indução de agentes químicos (MARANGA et al., 2003; RAFFOUL et al., 2005; SOUZA et al., 2005), o presente trabalho não pode ser um comparativo entre sistemas de expressão, pois a nossa proteína de interesse ainda não foi expressa em outros sistemas e sim uma iniciativa de expressar uma proteína heteróloga biologicamente ativa, utilizando um sistema mais simples que o sistema baculovírus/ célula de inseto.

Neste trabalho, a expressão da proteína em sistema bacteriano teve pleno êxito, sendo que o nível de expressão da proteína APLOrEC (0,5 µg/ml) foi suficiente para a condução dos testes e experimentos, visando a identificação e caracterização da proteína recombinante em relação ao seu efeito antiapoptótico. A proteína gerada foi obtida dentro de um agregado insolúvel, ou seja, corpúsculos de inclusão, como mostra a figura 16, como era esperado que ocorresse na expressão de genes heterólogos em procariontes. A solubilização pode ser obtida com ajuda de agentes desnaturantes como: uréia, cloreto de guanidina e N-lauroyl-sarcosine (JEVSEVAR et al., 2005; SAMBROOK; RUSSELL., 2001).

No entanto, a expressão de proteínas na forma de corpúsculo de inclusão pode ser vantajosa. Inicialmente, os corpos de inclusão podem ser acumulados no citoplasma em

altos níveis, muitas vezes ultrapassando 25% do total de proteínas. Além disso, eles contêm uma grande quantidade de proteína praticamente pura. Por não apresentarem atividade biológica relacionada à forma, facilitam a produção de proteínas tóxicas cuja toxicidade esteja ligada à forma, por exemplo, enzimas ou receptores (VILLAVERDE; CARRIÓ, 2003).

Outro grande benefício é que esses agregados insolúveis são, na maior parte, protegidos de degradação proteolítica, permitindo alta produção protéica. E finalmente, a produção de proteína pode ter um aumento significativo quando produzida por alta densidade de cultura celular (CHOI; KEUM; LEE, 2006).

Um aspecto positivo deste trabalho foi tirar vantagem desses altos níveis de expressão, sendo capaz de converter proteínas na forma de corpos de inclusão em produtos solúveis, como mostra o teste piloto, realizado com tampões em diferentes concentrações de uréia (Figura 17). O processo de *refolding* foi realizado através de uma diálise simples contra água tipo 1 conforme relatado em materiais e métodos no item 3.10.4 e permitiu obter uma proteína bioativa, demonstrada pelos testes de efeito protetor positivo da APLOrEC em cultivos celulares desafiados com indutor químico de morte (item 4.7).

A superexpressão de proteínas recombinantes em *E. coli* frequentemente demanda a formação de pontes dissulfeto e modificações pós-traducionais, como a glicosilação, para alcançar uma conformação igual à nativa e biologicamente ativa (BANEYX; MUJACIC, 2004; JEVSEVAR et al., 2005; JONASSON et al., 2002). Através do programa ExPASy Proteomics Server (NetNGlyc 1.0 Server), a proteína recombinante antiapoptótica foi analisada quanto a presença ou ausência de glicosilações e embora apresente potenciais motivos para sua ocorrência, não apresentou peptídeos de sinal expostos à maquinaria de N- glicosilação, e provavelmente a proteína nativa não apresenta glicosilação em *Lonomia obliqua*.

O processo de purificação de uma proteína é baseado na diferença entre as propriedades físico-químicas do produto de interesse e as das impurezas, como: localização (intra ou extracelular), massa molecular, carga elétrica, hidrofobicidade, solubilidade e afinidade por ligantes específicos e, existe uma gama de metodologias que podem ser aplicadas nesta etapa.

Para este estudo, dois procedimentos foram realizados para a purificação da proteína: por cromatografia, utilizando uma coluna de afinidade His Trapp FF (GE Healthcare) de 5 ml (não apresentado em material e métodos) e através de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) (item 3.10.3). Ambas as metodologias

apresentam os mesmos princípios, ou seja, especificidade pela cauda de histidina, porém o metal utilizado na coluna His Trapp FF é o níquel, já a *bead* é revestida por cobalto. A purificação realizada por His Trapp FF foi menos eficiente em relação à cromatografia por *beads*, sendo esta, utilizada para este estudo com o devido tampão (Figura 18). Muitas possibilidades devem ser analisadas e estudadas para esclarecer a dificuldade da purificação em coluna de afinidade His Trapp, desde a concentração muito baixa de proteínas encontradas na amostra analisada, até possíveis problemas na solubilização dos corpúsculos de inclusão. Esta última etapa não garante a solubilização dos corpúsculos de inclusão e sim, sua liberação do meio intracelular, podendo o mesmo, ter passado pela coluna sem ser retido, resultando num problema para a purificação através deste método.

A retirada do excesso de uréia e a tentativa de renaturação da proteína foram realizadas através de diálise (item 4.6.3) e, os resultados apresentados pelas figuras 20, 21, 22 e 23, indicam que a proteína possivelmente foi solubilizada e manteve a sua atividade.

A APLOrEC obtida, utilizada na concentração 0,5 µg/ml foi analisada quanto ao efeito protetor em células VERO e L929 induzidas a morte celular por T-BHP e H₂O₂. O efeito protetor pôde ser observado em ambas linhagens, porém, somente após indução com peróxido de hidrogênio nas concentrações de 4 e 0,8 mM.

A atividade antiapoptótica foi determinada por diferentes metodologias, protegendo diferentes tipos celulares da morte induzida por H₂O₂. Isto pode ser uma indicação de que o mecanismo de ação antiapoptótica da APLOrEC deva ser em níveis bastante básicos.

MARTINS, L. M. (2011) realizou um estudo prévio do efeito da proteína antiapoptótica da hemolinfa de *L. obliqua* sobre uma das vias clássicas de apoptose, a via mitocondrial, verificando o efeito desta proteína sobre o potencial elétrico da membrana mitocondrial de células de inseto após indução de apoptose por agentes indutores químicos e virais. Os dados relatados indicam que a proteína atua sobre a membrana das mitocôndrias, sendo capaz de manter alto o potencial de membrana mitocondrial, com evidente manutenção da permeabilidade da membrana, porém, os mecanismos de ação da proteína ainda não estão totalmente elucidados.

Apesar das alterações morfológicas de células apoptóticas serem evidentes, como demonstrado na figura 21, também foi realizada a determinação de morte por apoptose utilizando FITC-faloidina como marcador do citoesqueleto celular. O efeito protetor da APLOrEC é evidente nas concentrações 4 e 0,8 mM de H₂O₂ utilizadas em células VERO,

mostrando que a proteína recombinante obtida foi capaz de preservar a rede de actina e consequentemente, comprovando sua eficácia na manutenção do citoesqueleto após indução de morte pelo peróxido de hidrogênio.

Para a realização deste estudo, foram necessários três lotes de produção de APLOrEC, pois esta se mostrou uma proteína instável, com inatividade após 3 a 4 meses de sua fabricação.

6 CONCLUSÃO

- A bactéria *E. coli* se mostrou eficiente à proposta do trabalho, tanto para a clonagem quanto para a expressão da proteína recombinante.

- Todo o processo de obtenção da APLOrEC, desde a expressão até a possível renaturação, gerou uma proteína biologicamente ativa (através de modificações no protocolo) com rendimento médio de 50 µg/ml de proteína recombinante purificada, em um volume de 200 ml de meio de cultura bacteriana.

- O rendimento da proteína recombinante pode ter sido afetado pela etapa de renaturação requerida em sistema de expressão bacteriano, onde podem ocorrer perdas, devido ao uso de proteases utilizadas na lise celular, assim como também na etapa de purificação por *beads*, pois parte da proteína pode continuar ligada e não ser liberada com o tampão de eluição.

- Os corpúsculos de inclusão gerados foram aparentemente solubilizados, após visualização em géis de poliacrilamida.

- O mecanismo de ação da APLOrEC ainda não está totalmente elucidado, porém, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que sua atividade não está relacionada à sua conformação, pois o sistema bacteriano utilizado para a expressão da proteína, não possui a maquinaria e aparatos para realizar as modificações pós-traducionais necessárias para uma proteína que seja dependente de sua conformação para ser funcional.

- Apesar de ser mantida sempre em condições ideais de armazenamento (- 20 °C), a proteína se mostrou pouco estável (aproximadamente quatro meses).

- A proteína recombinante antiapoptótica de *Lonomia obliqua* obtida, mostrou atividade protetora nos testes realizados com indutor químico de morte por apoptose, porém, estudos mais relevantes devem ser implementados quanto à otimização do processo, visando um maior rendimento e estabilidade, assim como para a caracterização desta proteína, esclarecendo seu mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS*

- AROCHA-PINANGO, C. L.; GUERRERO, B. *Lonomia* genus caterpillar envenomation: clinical and biological aspects. **Haemostasis**, v. 31, p. 288-293, 2001.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, n.5, p.411-421, 1999.
- BANEYX F.; Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia Coli*. **Nature Biotechnology**, v. 22, p. 1399-1408, 2004.
- BELLÃO, C. **Avaliação de fontes de carbono e condições de indução na expressão de canacistatina em *Escherichia coli* BL21 (DE3)**. 2006. 90 f. (Dissertação de Mestrado) - Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.
- BROUSSEAU, R.; SCARPULLA R.; SUNG, W.; HSIUNG, H. M.; NARANG, S. A.; WU, R. Synthesis of a human insulin gene. V. Enzymatic assembly, cloning and characterization of the human proinsulin DNA. **Gene**, v.17, n.3, p.279-289, 1982.
- CARMO, A. C.V.; GIOVANNI, D. N. S.; CORRÊA, T. P.; MARTINS, L. M.; STOCCO, R. C.; SUAZO, C. A. T.; MORAES, R. H. P.; VEIGA, A. B. G.; MENDONÇA, R. Z. Expression of an antiviral protein from *Lonomia obliqua* hemolymph in baculovirus/insect cell system. **Antiviral research**, v.94, n.2, p.126-130. 2012.
- CARTIER, J.L.; HERSHBERGER, P.A.; FRIESEN, P.D. Suppression of apoptosis in insect cells stably transfected with baculovirus p35: dominant interference by N-terminal sequences p35. **Journal of Virology**, v. 68, p. 7728- 7737, 1994.
- CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. **A célula**. 2ª Ed. Barueri, SP: Manole, 2007. 380 p.
- CHA, H. J.; SHIN, H. S.; LIM, H. J.; CHO, H. S.; DALAL, N. N.; PHAM, M. Q.; BENTLEY, W. E. Comparative production of human interleukin-2 fused with green fluorescent protein in several recombinant expression systems. **Biochemical Engineering Journal**, v.24, n.3, p.225-233, 2005.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHERNYSH, S.; KIM, S. I.; BEKKER, G.; PLESKACH, V. A.; FILATOVA, N. A.; ANIKIN, V. B.; PLATINO, V. G.; BULLET, P. Antiviral and antitumor peptides from insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 12628-12632, 2002.

CHOI J.; KEUM K.; Lee S. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 876-885, 2006.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 297-306, 2009.

DUARTE, A. C.; CAOVILO, J. ; LORINI, I.; LORINI, D.; MANTOVANI, G. ; SUMIDA, J.; MANFRE, P. C. ; SILVEIRA, R. C.; DE MOURA, S. P. Insuficiência renal aguda por acidentes com lagartas. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 12, p. 184-187, 1990.

FERRER-MIRALLES, N. et al. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microbial Cell Factories**, v. 8, p. 17, 2009.

FRAILHA-NETO, H.; COSTA, D.; QUIROZ DE LEÃO, R. N.; BALLARINI, A. J. Acidentes hemorrágicos por larvas de *Lonomia obliqua* In: Schvartsman, S. **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. São Paulo: Sarvier, 1992. p. 241-244.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animals Cells: a manual of basic technique**. 5 ed. New York: Wiley-Liss, 2005. 642 p.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**. v. 25, p. 4798-4811, 2006.

GARCIA, E. S. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 11 (3):495-500, jul/set, 1995.

GARCIA, E. S.; CHAMAS, C. I. Molecular genetics: advances and problems. **Caderno de Saúde Pública**, v.12, n.1, p.103-107, 1996.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **GenBank**.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 20 abr. 2014.

GRACE, T. D. C. Effects of various substances on growth of silkworm tissue in vitro. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 11, p. 407-417, 1958.

GRACE, T. D. C. Establishment of four strains of cells from insect tissues growth in vitro. **Nature**, v. 195, p. 788-789, 1962.

GRACE, T. D. C. Establishment of a line of cells from the silkworm, *Bombix mori*. **Nature**, v. 216, 1967. 613 p.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? **Journal of Clinical Investigation**, v.115, n.10, p.2610-2617, 2005.

GRIVICICH, I., REGNER, A., ROCHA, A.B.D. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HAMDAOUI, A.; WATALEB, S.; DEVREESE, B.; CHIOU, S. J.; VANDEN BROECK, J.; VAN BEEUMEN, J.; DE LOOF, A.; SCHOOFS, L. Purification and characterization of a group of five novel peptide serine protease inhibitors from ovaries of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. **FEBS Letter**, v. 422, p. 74-78, 1998.

HERSHBERGER, P. A.; LACOUNT, D. J.; FRIESEN, P. D. The apoptotic suppressor P35 is required early during baculovirus replication and is targeted to the cytosol of infected cells. **Journal of Virology**, v.68, n.6, p.3467-3477, 1994.

HUBERMAN, A.; AGUILAR, M. B.; NAVARRO-QUIROGA, I.; RAMOS, L.; FERNANDEZ, I.; WHITE, F. M.; HUNT, D. F.; SHABANOWITZ, J. A hyperglycemic peptide hormone from the Caribbean shrimp *Penaeus (litopenaeus) Schmitt*. **Peptides**, v. 21, p. 331-338, 2000.

JEVSEVAR S.; GABERC-POREKAR V.; FONDA I.; PODOBNIK B.; GRDADOLNIK J.; MENART V. Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. **Biotechnology Progress**, v. 21, p.632-639, 2005.

JONASSON, P.; LILJEQVIST S.; NYGREN P.A.; Stahf, S. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 35, p. 91-105, 2002.

JONES, G.; MANCZAK, M.; HORN, M. Hormonal regulation and properties of a new group of basic hemolymph proteins expressed during insect metamorphosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 1284-1291, 1993.

KANAYA. T.; KOBAYASHI, J. Purification and characterization of an insect haemolymph protein promoting in vitro replication of the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 1135-1141, 2000.

KANOST, M.R.; KAWOOYA, J.K.; LAW, J.H.; RYAN, R.O.; VAN HEUSDEN, M.C.; ZIEGLER, R. Insect haemolymph proteins. **Advances in Insect Physiology**, v. 22, p.229 - 396, 1990.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KRAMMER, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, v.407, p. 789-795, 2000.

KRETZMER, G. Industrial processes with animal cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, n.2-3, p.135-142, 2002.

KURATA, K.; NAKAMURA, M.; OKUDA, T.; HIRANO, H.; SHINBO, H. Purification and characterization of a juvenile hormone binding protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 109, p. 105-114, 1994.

LAMBERT, J. C.; CHARTIER-HARLIN, M. C.; COTTEL, D.; RICHARD, F.; NEUMAN, E.; GUEZ, D.; LEGRAIN, S.; BERR, C.; AMOUYEL, P.; HELBECQUE, N. Is the LDL receptor- related protein involved in Alzheimer's disease? **Neurogenetics**, v. 2, p. 109-113, 1999.

LEMAIRE, C. Revision of Genus *Lonomia* Walker [Lep-Attacidae]. **Annales De La Societe Entomologique De France**, v.8, n.4, p.767-861. 1972.

LIN, C. Y.; CHEN, S. H.; KOU, G. H.; KUO, C. M. Identification and characterization of a hyperglycemic hormone from freshwater giant pawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v. 121, p. 315-321, 1998.

LORINI, L. M. **A taturana** - aspectos biológicos e morfológicos da *Lonomia obliqua*. Passo Fundo: Editora da Universidade de Passo Fundo, 1999. 67 p.

LOWENBERGER, C.; CHARLET, M.; VIZIOLI, J.; KAMAL, S.; RICHMAN, A.; CHRISTENSEN B. M.; BULET, P. Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and mRNA expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 20092- 20097, 1999.

MARANGA, L.; MENDONÇA, R. Z.; BENGALA, A.; PEIXOTO, C. C.; MORAES, R. H. P.; PEREIRA, C. A.; CARRONDO, M. J. T. Enhancement of Sf-9 cell growth and longevity through supplementation of culture medium with hemolymph. **Biotechnology Progress**, v.19, p.58-63, 2003.

MARTINS, L. M. **Estudo do efeito de uma proteína antiapoptótica obtida da hemolinfa de *Lonomia obliqua* sobre as mitocôndrias de células Sf-9**. 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MENDONCA, R. Z.; ARRÓZIO, S. J.; ANTONIAZZI, M. M.; FERREIRA, J. M. C.; PEREIRA, C. A. Metabolic active-high density VERO cell cultures on microcarriers following apoptosis prevention by galactose/glutamine feeding. **Journal of Biotechnology**, v.97, p.13-22, 2002.

MENDONÇA, R. Z.; GRECO, K. N.; SOUSA, A. P. B.; MORAES, R. H. P.; ASTRAL, R. M.; PEREIRA, C. A. Enhance effect of a protein obtained from *Lonomia obliqua* hemolymph in the recombinant protein production. **Cytotechnology**, v. 57, p. 83-91, 2008.

MENESES-ACOSTA, A.; MENDONÇA, R. Z.; MERCHANT, H.; COVARRUBIAS, L.; RAMIREZ, O. T. Comparative characterization of cell death between Sf-9 insect cells and hybridoma cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v.72, p.441-457, 2001.

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**. São Paulo: Editora Rocca, 2008, v.1.

MORAES, H. P. M. **Lagartas urticantes**. **Biológico**, São Paulo, v. 59. n. 2. p. 21-25.

PETERS, I. D.; RANCOURT, D. E.; DAVIES, P. L.; WALKER, V. K. Isolation and characterization of an antifreeze protein precursor from transgenic *Drosophila*: evidence for partial processing. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1171, p. 247-254, 1993.

PORATH, J.; CARISSON, J.; OLSSON, I.; BELFRAGE, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, v. 258, p. 598-599, 1975.

RAFFOUL, T.; SWIECH, K.; ARANTES, M. K.; SOUZA, Á. P. B. D.; MENDONÇA, R. Z.; PEREIRA, C. A.; SUAZO, C. A. T. Performance evaluation of CHO-K1 cell in culture medium supplemented with hemolymph. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p.85-95, 2005.

RANGANATH, R. M.; NAGASHREE, N. R. Role of programmed cell death in development. **International Review of Cytology**, v. 202, p. 159-242, 2001.

RHEE, W. J.; KIM, E. J.; PARK, T. H. Kinetic effect of silkworm hemolymph on the delayed host cell death in an insect cell- baculovirus system. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 1028- 1032, 1999.

RHEE, W. J.; PARK, T. H. Silkworm Hemolymph Inhibits Baculovirus- Induced Insect Cell Apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 271, p. 186-190, 2000.

RIGGS, A. D. Bacterial production of human insulin. **Diabetes Care**, v.4, n.1, p.64-68, 1981.

RYAN R.; ANDERSON D.; GRIMES W.; LAW J. Arylphorin from *Manduca sexta*: carbohydrate structure and immunological studies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 243, p.115 – 124, 1985.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, NY.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 3 v.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, p. 528-537, 2000.

SCHULER, M.; MAURER, U.; GOLDSTEIN, J. C. p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, p. 451-460, 2003.

SHIOTSUKI, T.; BONNING, B. C.; HIRAI, M.; KIKUCHI, K.; HAMMOCK, B. D. Characterization and affinity purification of juvenile hormone esterase from *Bombyx mori*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, p. 1681- 1687, 2000.

SOUZA, A. P. B.; PEIXOTO, C. C.; MARANGA, L.; CARVALHAL, A. V.; MORAES, R. H. P.; MENDONÇA, R. M. Z.; PEREIRA, C. A.; CARRONDO, M. J. T.; MENDONÇA, R. Z. Purification and characterization of an anti-apoptotic protein isolated from *Lonomia obliqua* hemolymph. **Biotechnology Progress**, v.21, p.99-105, 2005.

STRASSER, A.; JOST, P.J.; NAGATA, S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. **Journal of Immunity**, v.30, p. 180-192, 2009.

TELFER W.; KEIM P.; LAW J. Arylphorin, a new protein from *Hyalophora cecropia*: Comparisons with calliphorin and manducin. **Insect Biochemistry**, v.13, p. 601 – 613, 1983.

VEIGA, A. B. G.; RIBEIRO, J. M. C.; GUIMARÃES, J. A.; FRANCISCHETTI, I. M. B. A catalog for the transcripts from the venomous structures of the caterpillar *Lonomia obliqua*: identification of the proteins potentially involved in the coagulation disorder and hemorrhagic syndrome. **Gene**, v.355, p.11-27, 2005.

VERMUNT, A. M.; VERMEESCH, A. M.; KORT, C.A. Purification and characterization of juvenile hormone esterase from hemolymph of the Colorado potato beetle. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 35, n.3, p. 161-277, 1997.

VIEIRA, H. L.A.; BOYA, P.; COHEN, I.; EL HAMEL, C.; HAOUZI.; DRUILLENEC, S.; BELZACQ. S.; BRENNER, C.; ROQUE, R.; KROEMER, G. Cell permeable BH3- peptides overcome the cytoprotective effect of Bcl-2 and Bcl-x₁. **Oncogene**, v. 21, p. 1963-1977, 2002.

VILLAVERDE A, CARRIÓ M. M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. **Biotechnology Letters**, v. 2, p. 1385-1395, 2003.

WANG, W.; ROBERTS, C. J. **Aggregation of therapeutic proteins**. Hoboken, N. J.; Wiley, 2010. 453 p.

WERTZ, I. E.; HANLEY, M. R. Diverse molecular provocation of programmed cell death. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 21, p. 359-364, 1996.

WYATT, S. S. Culture in vitro of tissue from the silkworm *Bombix mori*. **Journal of General Physiology**, v. 39, p. 841-852, 1956.

WOO, S. D.; KIM, W. J.; CHOI, J. Y.; JIN, B. R.; KANG, S.K. Effect of silkworm hemolymph on the expression of *E. coli* beta galactosidase in insect cell lines infected with recombinant baculoviruses. **Molecular Cell**, v. 7, p. 572- 574, 1997.

YAMAMOTO, Y.; WATABE, S.; KAGEYAMA, T.; TAKAHASHI, S. Y. Purification and characterization of *Bombix* cysteine proteinase inhibitors from the hemolymph of *Bombix mori*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 42, p. 119-129, 1999.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH. P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, p. 124-128, 2004.

ZHU, S.; LI, W.; JIANG, D.; ZENG, X. Evidence for the existence of insect defensin-like peptide in scorpion venom. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 50, p. 57-61, 2000.