LUCIANA MOREIRA MARTINS

**ESTUDO DO EFEITO DE UMA PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA OBTIDA DA
HEMOLINFA DE *LONOMIA OBLIQUA* SOBRE AS MITOCÔNDRIAS DE
CÉLULAS SF-9.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2011

LUCIANA MOREIRA MARTINS

**ESTUDO DO EFEITO DE UMA PROTEÍNA ANTIAPOPTÓTICA OBTIDA DA
HEMOLINFA DE *LONOMIA OBLIQUA* SOBRE AS MITOCÔNDRIAS DE
CÉLULAS SF-9.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli
Mendonça

Versão original

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Martins, Luciana Moreira.

Efeito de uma proteína antiapoptótica obtida da hemolinfa de *Lonomia obliqua* sobre as mitocôndrias de células Sf-9 / Luciana Moreira Martins. -- São Paulo, 2011.

Orientador: 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: Bioquímica de proteínas.

Versão do título para o inglês: Effect of an anti-apoptotic protein obtained from the hemolymph of *Lonomia obliqua* on the mitochondria of cells Sf-9.

Descritores: 1. Proteína 2. Apoptose 3. Mitocôndrias 4. Hemolinfa 5. *Lonomia obliqua* I. Mendonça, 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/SBIB0201/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Luciana Moreira Martins.

Título da Dissertação: Efeito de uma proteína antiapoptótica obtida da hemolinfa de *Lonomia obliqua* sobre as mitocôndrias de células Sf-9.

Orientador(a): Ronaldo Zucatelli Mendonça.

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Dedico este trabalho

*A minha mãe Vanda, meus irmãos, Rodrigo e
Ana Luiza, meu sobrinho Victor e meu marido
Abner, por todo apoio, compreensão, carinho,
por sempre acreditarem em mim e
principalmente pelo amor incondicional. Vocês
são a razão da minha vida, amo muito todos
você.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça, meu orientador, pela oportunidade concedida, pela atenção, carinho, conversas, apoio e todos os ensinamentos que levarei para toda minha vida pessoal e profissional.

A Prof. Dr^a Darci Moraes Barros Battesti, pela oportunidade de desenvolver este trabalho no laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan e pelo incentivo profissional.

Um agradecimento especial a minha grande amiga Kátia, sem a qual eu nunca estaria aqui, pois estava sempre disposta a me ensinar e me ajudou a dar os primeiros passos da minha carreira.

Aos amigos de parceria do laboratório: Ana Carolina, Nathália, Kelly e Dalton, pela parceria e por estarem sempre dispostos a me ajudar, conversar, ouvir, aconselhar.

Aos amigos do laboratório: Fernando, Luiza, Cibele, Felipe, Reinaldo, Diego, Janio, Gabriel, Jéssica, Leila, Ana, Polly e Juliane, pela amizade, por estarem sempre por perto e me proporcionarem momentos maravilhosos de descontração.

Em especial a Juliana e Taisy, por serem as melhores amigas e companheiras que uma pessoa poderia ter em toda sua vida, tenho muita sorte de ter as duas ao meu lado, amo muito vocês.

A todos os colegas do laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan e aos colaboradores desse trabalho, Betão, Pedro e Martha, pelo inestimável auxílio, convivência, ensinamentos, força e pela paciência.

As minhas queridas amigas da faculdade, Simone, Ana Paula e Nathália, pela amizade verdadeira, pela torcida e por mesmo longe, sempre estão perto.

As minhas queridas e doces amigas e primas da vida inteira, Anita, Renata, Fe, Juju, Alana, Bianca, Paola, Monise, Greta. Amo todas vocês demais...

A minha mãe Vanda e meus irmãos Rodrigo e Ana Luiza em especial, por ser a melhor família do mundo, por estarem sempre ao meu lado me dando força para continuar e nunca desistir dos meus sonhos, pela amizade, cumplicidade, carinho.

Agradeço novamente a minha irmã Aninha e ao meu cunhado Tiago, por me darem um sobrinho, Victinho, que me deu uma nova razão de vida e a encheu de muita alegria.

Ao meu eterno companheiro e amor, Abner, por ser uma das pessoas mais incríveis que já conheci, por acreditar muito em mim, até mais que eu mesma, por sempre ter uma palavra de incentivo, por sempre entrar de cabeça nos meus planos mais loucos e, principalmente, por me ensinar o que é o amor verdadeiro e encher minha vida de alegria todos os dias.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Enfim a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Obrigada por tudo!

*“Renda-se, como eu me rendi.
Mergulhe no que você não conhece
como eu mergulhei.*

*Não se preocupe em entender, viver
ultrapassa qualquer entendimento”.*

Clarice Lispector

RESUMO

MARTINS, L. M. **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.

O sistema de expressão de proteínas que utiliza baculovírus como vetor tem sido intensamente utilizado para a produção de proteínas recombinantes, pois ele permite a formação de modificações pós-traducionais e conta com a presença de um forte promotor, a poliedrina. Entretanto, em alguns casos, esse sistema de expressão não é tão eficaz, pois a infecção das células por baculovírus induz morte por apoptose, limitando assim, a produção industrial de várias proteínas recombinantes de interesse. As mitocôndrias têm um importante papel no controle do processo de morte por apoptose, pois, durante a transdução de um sinal de apoptose em uma célula, ocorre uma alteração na permeabilidade da membrana da mitocôndria, acarretando na formação de poros, que podem ser causados pela perda do potencial eletroquímico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$). A formação desses poros leva à liberação de proteínas apoptogênicas, como o citocromo c, no citosol, que, por consequência, ativam proteínas proteolíticas conhecidas como caspases e DNases e o processo de morte torna-se irreversível. Reportamos a ocorrência de apoptose em cultivos de células de insetos e de mamíferos com depleção de nutrientes ou induzidos por agentes químicos e virais, e a suplementação dessas culturas com hemolinfa de *Lonomia obliqua* é capaz de estender a viabilidade da cultura evitando a morte por apoptose. Este trabalho teve como objetivo verificar previamente o mecanismo de ação antiapoptótica de um isolado protéico da hemolinfa de *Lonomia obliqua*. A identificação deste mecanismo poderá auxiliar no desenvolvimento de estratégias para controlar a apoptose em cultivo de células permitindo a otimização da produtividade viral e de proteínas recombinantes. Os testes de atividade antiapoptótica da hemolinfa bruta foram realizados em células Sf-9 e foi verificado que a suplementação dos cultivos celulares com apenas 1% de hemolinfa foi suficiente para aumentar o crescimento e a viabilidade das células por no mínimo três dias. A hemolinfa bruta e a fração da proteína isolada por cromatografia líquida foram utilizadas nos experimentos que visaram determinar o efeito dessa proteína sobre as mitocôndrias. Os dados obtidos neste trabalho sugerem que esta proteína atue sobre as membranas das mitocôndrias, sendo capaz de manter alto o potencial de membrana mitocondrial, visto que, em todos os experimentos, foi observado um bloqueio da morte por apoptose, com evidente proteção do potencial de membrana mitocondrial.

Palavras-chave: Proteína. Apoptose. Mitocôndrias. Hemolinfa. *Lonomia obliqua*.

ABSTRACT

MARTINS, L. M. **Effect of an anti-apoptotic protein obtained from the hemolymph of *Lonomia obliqua* on the mitochondria of cells Sf-9**. 2011. 87 p. Master thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The protein expression system using baculovirus as a vector has been intensively used for the production of recombinant proteins because it allows the formation of post-translational modifications and has the presence of a strong promoter, polyhedrin. However, in some cases, this expression system is not as effective because the infection of cells by baculovirus induces death by apoptosis, thereby limiting the industrial production of various recombinant proteins of interest. Mitochondria have an important role in controlling the process of death by apoptosis, because during the transduction of a signal of apoptosis in a cell, there is a change in membrane permeability of mitochondria, resulting in the formation of pores, which can be caused by loss of mitochondrial membrane electrochemical potential ($\Delta\Psi_m$). The formation of these pores leads to the release of apoptogenic proteins such as cytochrome c in the cytosol, which consequently activate proteolytic proteins known as caspases and DNase and the dying process becomes irreversible. We report the occurrence of apoptosis in cultured insect cells and mammalian depleted of nutrients or induced by chemical and viral agents, and supplementation of these cultures with hemolymph of *Lonomia obliqua* is able to extend the viability of the culture avoiding death by apoptosis. This study aimed to determine in advance the anti-apoptotic mechanism of action of a protein isolated from hemolymph of *Lonomia obliqua*. The identification of this mechanism may help develop strategies for controlling apoptosis in cell culture allowing the optimization of productivity of viral and recombinant proteins. Tests for anti-apoptotic activity of crude hemolymph were performed in Sf-9 cells and were found that supplementation of cell cultures with only 1% of hemolymph was sufficient to enhance growth and viability of cells for at least three days. The crude and the fraction of the hemolymph protein isolate by liquid chromatography were used in experiments aimed at determining the effect of protein on the mitochondria, checking its action on the mitochondrial membrane potential. The data from this study suggest that this protein is the action on the membranes of mitochondria, being able to maintain high mitochondrial membrane potential, since in all experiments, there was a death by blocking apoptosis, with clear protection mitochondrial membrane potential.

Key words: Protein. Apoptosis. Mitochondrias. Hemolymph. *Lonomia obliqua*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Mariposa fêmea e macho de <i>Lonomia obliqua</i>	14
Figura 2 - Lagartas <i>Lonomia obliqua</i>	15
Figura 3 - Cerdas e acidente causado por <i>Lonomia obliqua</i>	16
Quadro 1- Comparação entre sistemas de expressão recombinantes.....	20
Quadro 2 - Técnicas de cromatografia líquida.....	24
Figura 4 - Estágios do processo de apoptose em célula Vero.....	27
Figura 5 - Diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por necrose e apoptose.....	28
Figura 6 - Apoptose via mitocondrial.....	30
Figura 7- Mecanismos moleculares da permeabilização mitocondrial da membrana externa (MOMP).....	31
Figura 8 - Células de inseto <i>Spodoptera frugiperda</i> da linhagem Sf-9 normais e infectadas.....	35
Figura 9 - Representação da emissão do JC-1.....	47
Figura 10 - Determinação da citotoxicidade da hemolinfa em células Vero.....	48
Figura 11- Cinética de crescimento de células Vero.....	50
Figura 12 - Porcentagem de células Sf-9 viáveis em cultura.....	50
Figura 13 - Número de células Sf-9 viáveis em diferentes tempos de adição de hemolinfa.....	51
Figura 14 - Cromatografia de gel filtração (Sephacryl 200) da hemolinfa de <i>Lonomia obliqua</i>	52
Figura 15 - Cromatografia de troca iônica (Resource Q).....	53
Figura 16 - Gel de eletroforese SDS-PAGE.....	54
Figura 17 - Microscopia de fluorescência de células Sf-9.....	55
Figura 18 - Porcentagem de células Sf-9 apoptóticas em culturas tratadas ou não com 1% (v/v) da fração purificada da hemolinfa.....	55
Figura 19 - Citometria de fluxo de células Sf-9 infectadas ou não com baculovírus (5 MOI) e tratadas ou não com Hb.....	57
Figura 20 - Intensidade de fluorescência ($\Delta\Psi_m$) em cultivos de células Sf-9.....	58
Figura 21 - Viabilidade de células Sf-9 após indução com t-BHP por 4 horas e com pré-tratamento ou não com hemolinfa total ou fração purificada (1% v/v).....	59
Figura 22 - Viabilidade de células Sf-9 após indução com t-BHP <i>overnight</i>	59

Figura 23 - Porcentagem de células Sf-9 com alto $\Delta\Psi_m$ após indução com H_2O_2 por 4 horas.....	60
Figura 24 - Efeito da hemolinfa na proteção da morte celular por H_2O_2	61
Figura 25 - Efeito da hemolinfa na proteção de morte celular induzida por indutores químicos de apoptose.....	62
Figura 26 - Fotomicrografias de células Sf-9 após a indução da morte celular.....	63
Figura 27 - Géis de eletroforese bidimensional de células Vero corados com coomassie blue.....	65
Figura 28 - Géis de eletroforese bidimensional de células Vero corados com nitrato de prata.....	66
Figura 29 - Análise prévia da expressão de proteínas.....	67
Figura 30 - Sequência C-terminal da proteína antiapoptótica.....	68
Figura A.1. Representação esquemática do procedimento de cultivo das amostras virais através de diluições seriadas.....	85
Figura A.2. Metodologia do cálculo da titulação viral.....	86

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Biologia da <i>Lonomia obliqua</i>	14
1.2 A hemolinfa	16
1.3 Cultivo de células de insetos	17
1.4 O sistema de expressão de proteínas recombinantes em células de inseto	19
1.5 As proteínas	22
1.6 Cromatografia líquida	23
1.7 Apoptose	25
1.7.1 Morte Celular Programada ou Apoptose	25
1.7.2 As vias sinalizadoras e o papel das mitocôndrias no processo de apoptose	28
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo Geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Linhagem celular, sistema de cultivo celular e vírus	34
3.1.1 Estoque criogênico de células	34
3.1.2. O baculovírus	35
3.1.2.1 Estoque viral	36
3.2 Obtenção de hemolinfa	36
3.2.1 Citotoxicidade	37
3.3 Fracionamento da hemolinfa por cromatografia líquida	37
3.4 Procedimentos analíticos	39
3.4.1 Concentração e viabilidade celular	39
3.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	39
3.4.3 Eletroforese bidimensional (2-D)	40
3.4.4 Métodos de coloração dos géis de poliacrilamida uni e bidimensional	42
3.4.5 Quantificação de proteínas	43
3.4.6 Digestão protéica	43
3.4.6.1 Espectrometria de massa e obtenção da sequência de aminoácidos da região C-terminal da proteína antiapoptótica	44

3.5 Procedimentos para análises de apoptose celular	44
3.5.1 Determinação do efeito antiapoptótico da hemolinfa e da proteína purificada (Frp)	44
3.5.2 Participação da mitocôndria no processo de apoptose	45
3.5.2.1 Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células Sf-9 por DiOC6(3)	45
3.5.2.2 Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células SF-9 por JC-1	46
4 RESULTADOS	47
4.1 Efeito da Hemolinfa sobre as células	48
4.1.1 Determinação da citotoxicidade da hemolinfa	48
4.1.2 Análise do efeito da hemolinfa sobre a cinética de crescimento, a concentração e a viabilidade celular	49
4.2 Purificação da hemolinfa	52
4.2.1 Cromatografia de gel filtração em coluna “Sephacryl S200”	52
4.2.2 Cromatografia de troca iônica em coluna “Resource Q”	53
4.3 Efeito da hemolinfa sobre a apoptose	54
4.4 Efeito da hemolinfa sobre as mitocôndrias	57
4.4.1 Determinação do efeito da hemolinfa sobre o potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células Sf-9 após infecção por baculovírus	57
4.4.2 Efeito de diferentes concentrações de t-BHP sobre o potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células Sf-9	58
4.4.4 Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células Sf-9 após a indução de morte celular com t-BHP e H ₂ O ₂ e marcação com JC-1 e Hoechst 33324	62
4.5 Eletroforese bidimensional de células Vero	64
4.6 Espectrometria de massa e obtenção da sequência de aminoácidos da região C-terminal da proteína antiapoptótica	67
5 DISCUSSÃO	69
6 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS*	75
APÊNDICE	84
ANEXO	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biologia da *Lonomia obliqua*

Lonomia obliqua é uma espécie do filo *Artropoda*, classe *Insecta*, ordem *Lepidoptera*, família *Saturniidae*, pertencente ao gênero *Lonomia*. Originalmente o gênero *Lonomia* foi descrito por Walker (*L. Achelous*) no Suriname, porém tem sido encontrado na região zoogeográfica neo-tropical distribuído nas Guianas, El Salvador, Equador, México, Costa Rica, Panamá, Honduras Britânica, Guatemala, Suriname, Nicarágua, Trinidad, Venezuela, Colômbia, Peru, Argentina e Brasil (LEMAIRE, 1972; FRALHA-NETO et al., 1992).

A literatura vigente descreve a existência de seis estágios larvais (instares) de ocorrência em um período de aproximadamente 94 dias, chegando a medir cerca de 7 (sete) centímetros antes de atingirem a fase de pupa. A pupação apresenta um período bastante variado, podendo oscilar de 46 a 92 dias. Após a fase de pupa, as mariposas emergem, reiniciando o ciclo que apresenta dimorfismo sexual, sendo a mariposa fêmea maior e de coloração pardo-rosado e a mariposa macho menor e mais amarelada, com tonalidades mais vivas (**Figura 1**). Ambas as mariposas possuem uma listra transversal sobre as asas. A duração do ciclo de vida de *L. obliqua* é de no mínimo quatro meses e meio e máximo de oito meses e meio (MORAES, 1997; LORINI, 1999).

Figura 1- Mariposa fêmea e macho de *Lonomia obliqua*.

FONTE: Cedido por Moraes, R. H. P, 1997.

Lonomia obliqua é uma espécie de mariposa cuja fase larval, de hábito gregário (**Figura 2 A e B**), possui o corpo revestido por cerdas (espículas) urticantes que liberam toxinas com propriedades inflamatórias (**Figura 3 A e B**). Relatos de acidentes são comuns no Sul e no Sudeste do Brasil, e ocorrem quando a vítima toca as lagartas agrupadas ou não nos troncos das árvores (DUARTE et al., 1990). Uma vez em contato com a epiderme da vítima, as cerdas se quebram inoculando o veneno, iniciando-se o quadro de erucismo Lonômico. No local de contato surge uma sensação de dor e queimação, seguida por cefaléia occipital e náuseas, em cerca de 8 a 72 horas aparecem os sintomas que caracterizam a síndrome hemorrágica em humanos: hematúria, hemorragia de cicatrizes e mucosas, hemorragia intracerebral e insuficiência renal aguda (**Figura 3 C**) (AROCHA-PINANGO; GUERRERO, 2001).

Figura 2 - Lagartas *Lonomia obliqua*.

A) Um espécime isolado e **B)** um agregado de lagartas formando uma colônia.
FONTE: Cedidas por Moraes, R. H. P. (comunicação pessoal).

As lagartas de *Lonomia obliqua* apresentam coloração marrom esverdeada com listas longitudinais contínuas marrons escuras contornadas de preto. Apresentam também algumas manchas brancas no ápice dorsal e cerdas com diversas ramificações laterais (MORAES, 1997).

Figura 3 - Cerdas e acidente causado por *Lonomia obliqua*.

A) Cerdas (espículas) urticantes presentes no corpo das lagartas de *Lonomia obliqua*; **B)** uma cerda isolada; e **C)** Acidentado com *Lonomia obliqua*, mostrando o local de contato da epiderme com as cerdas da lagarta.

FONTE: Cedidas por Moraes, R. H. P, 1997.

1.2 A hemolinfa

A classe dos insetos representa cerca de 55% de toda a biodiversidade existente na terra e aproximadamente 85% de todos os animais. Os insetos podem ser encontrados em quase todos os ecossistemas do planeta, desde regiões polares até regiões de deserto. Esta larga distribuição dos insetos em regiões com características totalmente diferentes tem estimulado as pesquisas de novos agentes terapêuticos nesta classe de artrópodos (CHERNYSH et al., 2002).

Vários estudos realizados demonstraram a presença de substâncias farmacologicamente ativas na hemolinfa de insetos com efeitos enzimáticos (HAMDAOUI et al., 1998; YAMAMOTO et al., 1999; SHIOTSUKI et al., 2000), hormonais (JONES et al., 1993; KURATA et al., 1994; VERMUNT et al., 1997; LIN et

al., 1998; HUBERMAN et al., 2000), com ação imune, antibacteriana e antifúngica (LAMBERT et al., 1999; LOWENBERGER et al., 1999; ZHU et al., 2000) e anticongelamento (PETERS et al., 1993).

Nas décadas de 1950 e 1960, Wyatt (1956) e Grace (1958, 1962 e 1967), demonstraram o efeito da hemolinfa sobre o crescimento e o tempo de sobrevivência de células em cultivo. Todavia, após estes trabalhos pioneiros, muito pouco foi realizado neste sentido, sendo a hemolinfa, empregada inicialmente *in vitro* na manutenção de tecidos e células de insetos e sendo substituída posteriormente no cultivo celular por soro fetal bovino. Após muitos anos, surgiram alguns estudos demonstrando o efeito positivo da hemolinfa na promoção de crescimento viral (RHEE; KIM; PARK, 1999; RHEE; PARK, 2000; KANAYA; KOBAYASHI, 2000), na produção de proteínas recombinantes (WOO et al., 1997; MENDONÇA et al., 2008), assim como no efeito antiapoptótico em células de inseto (SOUZA et al., 2005).

Kanaya e Kobayashi (2000) isolaram e caracterizaram uma proteína presente na hemolinfa do bicho da seda (*Bombix mori*) capaz de aumentar a atividade de uma proteína recombinante (luciferase) em aproximadamente 10.000 vezes. No entanto, poucos estudos têm sido realizados buscando isolar e caracterizar os fatores envolvidos nestes efeitos e muito menos visando estudar o local de ação destas proteínas (OCHANDA, 1992; MOON et al., 1995; SHISHIKURA et al., 1997 e 1996; NUSSBAUMER et al., 2000).

Assim, sendo estes fatores identificados e isolados, poderão servir de auxílio na otimização do crescimento celular, na replicação viral de baculovírus que são utilizados na produção de bioinseticidas e na produção de proteínas recombinantes, permitindo a realização de cultivo celular mais eficiente e a produção de biofármacos a menores custos.

1.3 Cultivo de células de insetos

Aproximadamente há 100 anos ocorreu a primeira tentativa de se cultivar células de inseto. Até o início da década de 1960 ainda não havia conseguido se estabelecer uma linhagem celular, obtendo-se apenas um prolongamento na sobrevivência de tecidos (GRACE, 1962).

A principal dificuldade encontrada na manutenção das células *in vitro* era a inexistência de um meio de cultivo adequado. Alguns trabalhos realizados por Wyatt

(1956) e por Maranga et al. (2003) sobre a bioquímica da hemolinfa, viabilizaram a formulação de meios de cultura nos quais as células de insetos se desenvolvem com maior eficiência. Estes trabalhos não serviram somente para o desenvolvimento de meios de cultura de células de Lepidópteros (artrópodes da classe *Lepidoptera*), como mariposas e borboletas, mas também para destacar a importância da hemolinfa de invertebrados antes de se tentar o estabelecimento de culturas de forma empírica (MARANGA et al., 2003).

Dentre os aspectos relevantes que devem ser avaliados no cultivo celular, destacam-se a composição do meio de cultivo, a idade e densidade do inóculo celular e, em se tratando de células aderentes, o tipo de suporte para adesão celular. Células de inseto, geralmente, são cultivadas em suspensão, pois, não necessitam de suporte sólido e se desenvolvem livremente no meio de cultura. Outros fatores influenciam o cultivo celular, tais como a temperatura, o pH, a pressão osmótica, a agitação, e a concentração de oxigênio dissolvido no meio. As células de insetos desenvolvem-se na faixa de temperatura entre 27 a 29 °C, dependendo da linhagem utilizada. O pH adequado para estas células situa-se entre 6,1 a 6,4, não havendo a necessidade de acréscimo de dióxido de carbono, o que reduz a complexidade e os custos do cultivo (MITSUHASHI, 1989).

Estas células, quando comparadas às células de mamíferos, revelam-se mais robustas quanto ao cultivo, principalmente em relação à manutenção, facilidade de adaptação na mudança de sistemas aderentes para suspensos, e por apresentarem maior resistência a estresse ambiental, como mudanças de pH e de osmolaridade. Tornou-se primordial o conhecimento sobre o metabolismo das células, tanto para a formulação de novos meios de cultura, quanto para o uso de suplementos utilizados para a alimentação celular (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003).

O metabolismo de células de insetos lepidópteros, como as células da linhagem *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) apresenta um comportamento distinto quando comparado com o das células de mamíferos na presença de glicose e glutamina, não ocorrendo acúmulo de amônia e lactato mesmo em altas concentrações desses substratos (DREWS, 2000), sendo que o lactato pode ser produzido sob condições de estresse provocado pela limitação de oxigênio (IKONOMOU ; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003). No entanto, linhagens como as de *Trichoplusia ni* apresentam metabolismo similar ao das células de mamífero, que em disponibilidade de glicose e

glutamina, apresentam acúmulo de lactato e íons amônio no decorrer do cultivo celular (RHIEL; MURHAMMER, 1995).

Em 1978, Cestari e Simões, investigaram o uso de células de insetos como hospedeiras para o cultivo de parasitas. Atualmente, as células de inseto têm sido utilizadas em aplicações biotecnológicas para a expressão de genes exógenos através da tecnologia do DNA recombinante. Esta tecnologia tornou possível a obtenção de produtos terapêuticos em escala comercial como insulina, vacina contra hepatite B, hormônio de crescimento, ativador tissular do plasminogênio espécie-específico (tPA) e interferon- α (KRETZMER, 2002).

A primeira proteína terapêutica humana licenciada utilizando a tecnologia de DNA recombinante foi a insulina, em 1982, produzida em larga escala em *Escherichia coli*, que apresenta crescimento mais rápido comparado com o de células animais. Porém, devido à inviabilidade de expressão de proteínas complexas nas bactérias, o cultivo e expressão em células animais tornaram-se uma alternativa mais interessante para fins industriais (BUTLER, 2005). Cerca de metade dos produtos biofarmacêuticos em fase de testes clínicos é produzido através da tecnologia de proteínas recombinantes e movimenta 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, 2008).

As células Sf-9 são um bom suporte para ser utilizado neste tipo de estudo por ser uma linhagem bem estudada, crescer com facilidade em suspensão, permitir uma manipulação relativamente simples e possuir um excelente crescimento especialmente em biorreatores, o que permite seu uso em bioprocessos em maior escala. Outras características apresentadas pelas células Sf-9 são: alta capacidade de liberação de proteína por secreção, rápido crescimento permitindo tempos de incubação mais curtos, baixos gastos com substrato para manutenção e altos rendimentos celulares (DREWS, 2000; IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003).

1.4 O sistema de expressão de proteínas recombinantes em células de inseto

Existem vários sistemas de expressão de proteínas recombinantes, que foram desenvolvidos utilizando como hospedeiros, bactérias, leveduras, células de mamíferos, de plantas e, as células de inseto. A escolha de um sistema de

expressão ideal é muito importante para o sucesso da produção de proteína total, visando melhor funcionalidade protéica, rendimento de produção, rendimento de purificação e custos de produção. 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 assim por diante. Devido a esses fatores, nem sempre é fácil escolher um sistema de expressão adequado, pois cada sistema apresenta vantagens e desvantagens (**Quadro 1**) (CHA et al., 2005).

Quadro 1- Comparação entre sistemas de expressão recombinantes

	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: Adaptado de Cha et al., 2005.

As células de bactérias, em especial a bactéria *Escherichia coli*, foram por muitos anos o microrganismo hospedeiro mais usado para a produção de proteínas recombinantes, devido à sua capacidade de expressar grandes quantidades de proteínas heterólogas em menor tempo de produção e com fácil manipulação da cultura. No entanto, a formação de corpos de inclusão gerados nesse sistema pode ser um sério obstáculo para a expressão de genes heterólogos, pois a proteína recombinante deve ser redobrada em sua conformação nativa funcional. Além disso, a proteína que é expressa pode apresentar baixo rendimento, pois é produzida intracelularmente requerendo uma etapa de renaturação devido à ação de proteases empregadas na lise celular, além das bactérias, como microrganismos procariontes, não realizarem modificações pós-traducionais (BANEYX, 1999).

O sistema de expressão de proteínas que utiliza a levedura como hospedeiro necessita de meio de cultivo simples e de baixo custo. As leveduras são adaptadas para o crescimento fermentativo, e podem chegar a altos níveis de densidade celular, fornecendo a base para uma abundante expressão de proteína recombinante. Especificamente, o sistema de expressão que utiliza a levedura *Pichia pastoris* é mais apropriado para a expressão de proteínas heterólogas eucarióticas, por ter fácil manipulação, e também poder realizar modificações pós-traducionais e enovelamento de proteínas, porém não são capazes de realizar modificações pós-traducionais mais complexas (CREGG et al., 1993).

Já as células de mamíferos apresentam sinais de síntese facilmente reconhecidos, e a proteína recombinante pode ser expressa extracelularmente. Realizam modificações pós-traducionais complexas, além de poderem receber múltiplos plasmídeos. Porém, necessitam de meios ricos e de alto custo, possuem uma taxa de crescimento lenta e seu rendimento de expressão é muito baixo em comparação com os outros sistemas (CHA et al., 2005).

Como alternativa aos sistemas mencionados existe o sistema de expressão de proteínas em células de inseto, que utiliza o baculovírus, que é um vírus específico de insetos. Este sistema pode permitir a obtenção de uma maior quantidade de proteína, pois apresenta uma transformação celular estável (O'REILLY; MILLER; LUCKOW, 1992).

O sistema de expressão de proteínas que utiliza baculovírus como vetor (BEVS) normalmente utiliza como hospedeiros as linhagens de células *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) e *Trichoplusia ni* (Tn) (O'REILLY; MILLER; LUCKOW, 1992). Esse sistema tem sido intensamente utilizado para a produção de proteínas recombinantes por superar algumas deficiências dos sistemas procarióticos, como a falta de modificação pós-traducional, e do sistema que utiliza células de mamíferos, que possui níveis muito baixos de expressão (LUCKOW, 1991, WICKHAM et al., 1992; MARIANI; KRAMMER, 2000), além de possuir vantagens, como a de permitir a produção de proteínas recombinantes funcionais e imunogenicamente ativas e contar com a presença de um forte promotor, a poliedrina (KIM et al., 2000).

Tem sido relatado que este sistema permite a produção de altos níveis de proteínas recombinantes, as quais chegam a atingir 50% do total de proteínas das células (WICKHAM et al., 1992). Entretanto, em alguns casos, o sistema de expressão BEVS produz duas ordens de magnitude a menos de proteína secretada

quando são utilizadas células Sf-9 (LUCKOW, 1991), enquanto que para algumas proteínas esta produção chega a 1.000mg/L (WICKHAM et al., 1992). Em outros, como é o caso da eritropoetina, esta produção não chega a 10mg/L (WOJCHOWSKI et al., 1987), e a produção do ativador de plasminogênio (STEINER et al., 1988) ou da Interleucina-2 (SMITH et al., 1985) é de apenas 1 a 3 mg/L. Estas baixas quantidades tem limitado a produção industrial de várias proteínas de interesse, ou mesmo a obtenção de quantidades suficientes para estudos de cristalografia (GREENFIELD, 1988).

Apesar da popularidade do sistema inseto/baculovírus, uma das dificuldades encontradas na obtenção de proteínas recombinantes é a ocorrência de proteólise, devida principalmente à liberação de proteases, que ocorre como resultado do estresse causado pela infecção por baculovírus que são capazes de afetar a qualidade e a quantidade do produto de interesse produzido por este sistema. Além disso, a infecção de células por baculovírus induz morte celular por apoptose, limitando a produção das proteínas recombinantes, além de tornar problemática a purificação dessas proteínas (IKONOMOU; SCHNEIDER; AGATHOS, 2003).

1.5 As proteínas

As proteínas são constituintes essenciais das células e estão presentes no citoplasma como moléculas envolvidas em diversas rotas metabólicas. Estão entre as macromoléculas biológicas mais abundantes e são extremamente versáteis do ponto de vista funcional, pois estão envolvidas em catálise enzimática, transporte molecular, nutrição, motilidade, estrutura, defesa, sinalização, entre outras funções. Do ponto de vista químico, são moléculas constituídas, exclusivamente, por 20 aminoácidos, que unidos formam as cadeias polipeptídicas. As cadeias podem variar de 100 a 2.000 resíduos de aminoácidos, que determinam sua estrutura primária. A sequência de aminoácidos de uma proteína determina o tipo de conformação que ela vai apresentar e esta, por sua vez, determina a sua propriedade biológica (WANG; ROBERTS, 2010).

Muitas proteínas encontram-se ligadas covalentemente a glicídios, formando as glicoproteínas; outras estão ligadas a fosfatos, formando as fosfoproteínas, outras encontram-se associadas por interações iônicas a ácidos nucleicos formando as

nucleoproteínas, outras proteínas podem estar associadas aos lipídios, formando as lipoproteínas, e ainda, ligadas direta ou indiretamente aos metais, através de complexos coordenados, formando as metaloproteínas, como as ferropofirino-proteínas (LEHNINGER; NELSON; COX, 2007; WANG; ROBERTS, 2010).

A síntese de proteínas ocorre em supraestruturas moleculares, denominadas ribossomos, localizados nas células eucariotas, em série sobre o retículo endoplasmático. Essas supraestruturas moleculares encontram-se também nas mitocôndrias de todas as células de eucariontes e nos cloroplastos de células vegetais. A estrutura conformacional final de uma proteína simples é definida nos canais internos do retículo endoplasmático, assim como a incorporação das cadeias oligossacarídicas que constituem as glicoproteínas (LEHNINGER; NELSON; COX, 2007).

Um grande número de propriedades biológicas são exercidas pelas proteínas, justificando o interesse em estudá-las. O isolamento, purificação e caracterização fazem parte do processo de estudo de proteínas (SILVA JR, 2004). Os principais métodos utilizados neste trabalho para a purificação proteica, utilizando sistemas de purificação em cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) estão apresentados a seguir.

1.6 Cromatografia líquida

O processo cromatográfico baseia-se, de maneira geral, na distribuição diferenciada de solutos entre uma fase móvel e uma fase estacionária. Na cromatografia líquida, a fase móvel é o líquido que percorre a coluna cromatográfica, sendo denominado eluente, e a fase estacionária é a resina ou gel que preenche a coluna e se encontra suspensa no meio líquido. A grande variabilidade de combinações entre a fase móvel e a estacionária faz com que a cromatografia tenha uma série de técnicas diferenciadas (SILVA JR, 2004).

A escolha dos métodos de purificação através de cromatografia líquida e a estratégia a ser utilizada, baseia-se nas propriedades das proteínas de interesse. As principais características exploradas são: tamanho da molécula, a carga, polaridade e afinidade química. Além das características da proteína de interesse, a escolha da estratégia de purificação também depende das características dos outros compostos presentes no extrato bruto. Atualmente as metodologias cromatográficas estão bem

diversificadas e oferecem possibilidades para o isolamento e a obtenção de proteínas com alto grau de pureza (ALMEIDA; KURTENBACH, 2002).

No **Quadro 2**, apresentada a seguir, estão listadas técnicas de cromatografia líquida de acordo com a característica físico-química das proteínas exploradas. A condição inicial necessária para a realização da técnica, os eluentes mais comuns e as condições em que a solução de proteína ficará após sua eluição da coluna também são citados. O custo geral do processo é classificado levando-se em conta os valores aproximados das colunas e dos acessórios geralmente empregados em cada técnica.

Quadro 2 - Técnicas de cromatografia líquida

Tipo de Cromatografia	Característica da Proteína	Condição Inicial da Amostra	Eluentes	Condição Final da Amostra	Custo
Gel Filtração	Peso molecular	Volume da amostra <5% do volume da coluna	Qualquer solução aquosa	Amostra diluída em eluente	+
Troca Iônica	Carga	Baixa concentração iônica	Soluções salinas ou pHs distintos da condição inicial	Amostra concentrada em solução salina	++
Interação Hidrofóbica	Hidrofobicidade	Alta concentração de sal	Soluções com baixa concentração salina	Amostra concentrada em solução salina	++
Fase Reversa	Hidrofobicidade	Não pode conter altas concentrações de sais	Solvente orgânico	Amostra sem sais em solventes voláteis	+++
Afinidade	Especificidade à ligantes	Condições específicas para ligação	Alta concentração de ligante ou sais	Amostra concentrada contendo ou não ligante	+++

FONTE: Almeida; Kurtenbach, 2002.

Dentre os métodos de cromatografia líquida utilizados, mais rotineiramente, temos a cromatografia de exclusão ou gel filtração, a cromatografia de troca iônica, a cromatografia de interação hidrofóbica, a cromatografia de fase reversa, e a cromatografia por afinidade (SILVA JR, 2004). Neste trabalho, para a purificação das proteínas da hemolinfa de *Lonomia obliqua*, foram utilizadas as cromatografias líquidas em gel filtração e de troca iônica.

1.7 Apoptose

1.7.1 Morte Celular Programada ou Apoptose

A morte celular programada, mais comumente chamada de apoptose é descrita como um processo fisiológico e patológico de deleção de células, que possui um importante papel na manutenção da homeostase dos tecidos. Este processo de “suicídio” celular é altamente regulado, sendo um processo essencial para o crescimento e sobrevivência em todos os eucariotos (WERTZ; HANLEY, 1996).

O conceito revolucionário de morte celular por apoptose, contrastando com o de necrose, foi proposto por Kerr, Wyllie e Currie em 1972. As células fisiologicamente indesejáveis não necrosam, elas entram em processo de apoptose. A apoptose é a forma mais generalizada de morte celular, pois é a que ocorre tanto no desenvolvimento embrionário-fetal como ao longo da vida adulta. Muitas células podem controlar com precisão o tempo de sua própria morte pelo processo de apoptose (RANGANATH; NAGASHREE, 2001).

Os fundamentos sobre apoptose derivam de estudos realizados no nematódio hermafrodita *Caenorhabditis elegans*, que ao longo de seu desenvolvimento, produz exatamente 1090 células somáticas das quais 131 células devem ser submetidas a morte programada de forma a construir o corpo do adulto. A morte ocorre em uma sequência previsível sem provocar nenhuma reação local. Cada uma das células pode ser identificada ao microscópio de luz. A melhor evidência de que células animais têm um programa intrínseco de morte celular vem dos estudos genéticos neste nematódio; onde dois genes foram identificados como necessários para que ocorra a morte das 131 células citadas. São os genes *ced-3* e *ced-4* (*ced*, do inglês é a sigla para “cell death”, que significa “morte celular”). Se qualquer dos dois genes for inativado por mutação, as células que normalmente deveriam morrer, sobrevivem e se diferenciam em tipos celulares reconhecidos como, por exemplo, neurônios (LIU; HENGARTNER, 1999).

Muitas vezes, o suicídio das células não está programado, mas ocorre em resposta a fatores químicos e biológicos que ameaçam o resto do organismo. Como exemplo de células potencialmente danosas para o organismo que são eliminadas por apoptose temos: a) as infecções causadas por vírus. Uma célula infectada por

vírus que morre antes da conclusão do ciclo de infecção previne a propagação do vírus às células vizinhas.; b) as células que exibem lesão no DNA. A lesão no genoma pode induzir ruptura do desenvolvimento embrionário normal ou induzir a célula a sofrer transformação cancerosa. As células respondem à lesão no DNA aumentando seus níveis de p53, uma proteína que é potente indutora de apoptose; c) as células cancerosas. A radiação e drogas citotóxicas usadas na terapia do câncer induzem apoptose em muitas células cancerosas. Em princípio, em qualquer local onde se sabe que deva ter ocorrido morte celular, e onde não se detecta reação inflamatória, provavelmente a morte celular foi por apoptose (RANGANATH; NAGASHREE, 2001; SCHULER; MAURER; GOLDSTEIN, 2003).

O processo de apoptose apresenta características exclusivas, com padrões de alterações morfológicas e bioquímicas celulares, as quais incluem a formação de vacúolos citoplasmáticos, encolhimento e diminuição do contato entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear e condensação da cromatina na periferia do núcleo, que é consequência do colapso da cromatina resultante do descolamento das alças cromossômicas da lâmina nuclear que se desintegra durante a apoptose (**Figura 4**). Também ocorrem despolarização de membrana mitocondrial, fragmentação internucleossomal do DNA e alterações na assimetria de fosfolipídios de membrana plasmática (SARASTE; PULKKI, 2000; OBERHAMMER et al., 1993).

A fragmentação do núcleo e a condensação da cromatina são modificações precoces do processo de apoptose morfológicamente explícita (**Figura 4 A e B**). Estas modificações estão associadas à fragmentação da cromatina em sítios internucleossômicos por ação de endonucleases; que à eletroforese em gel de agarose os oligômeros de 180-200bp (pares de base) dão o padrão típico de bandas em escada. Nesta etapa a membrana celular e as endomembranas estão preservadas, sendo que as células não se coram no teste de exclusão celular pelo azul de tripan. Neste teste, o corante não atravessa a membrana intacta da célula não lesada, corando apenas as células mortas (FRESHNEY, 2005).

Os conteúdos citoplasmáticos se fragmentam no final do processo, e ocorre a formação de corpúsculos na superfície da célula e o citoplasma se fragmenta em corpos apoptóticos (**Figura 4 C**). Esses corpos apoptóticos são fagocitados por células vizinhas da mesma linhagem, ou por macrófagos, e os produtos monoméricos das proteínas e do DNA degradado (aminoácidos e nucleotídeos) são

liberados em um processo controlado, que permite que estes monômeros sejam retomados e reutilizados pelas células que os fagocitaram (**Figura 5 B**). Com isso, a apoptose permite que o organismo possa eliminar uma célula sem desperdiçar seus componentes (SARASTE; PULKKI, 2000).

Figura 4 - Estágios do processo de apoptose em célula Vero.

A) Evidências iniciais de apoptose no núcleo, com espaços na cisterna perinuclear e início de condensação da cromatina na periferia nuclear. No citoplasma, as organelas estão dilatadas. **B)** Núcleo apoptótico típico (seta vermelha), onde cinco aglomerados distintos de heterocromatina são observados. Em detalhe, uma célula em apoptose no mesmo estágio, observado em microscópio de fluorescência (seta azul). **C)** apoptose em estágio tardio, onde pode-se observar a eliminação de um corpo apoptótico contendo heterocromatina (seta verde) e degeneração das mitocôndrias. Núcleo (N); Mitocôndrias (m); Retículo endoplasmático (RE); Aparelho de Golgi (G); Heterocromatina (Ch); Ribossomos livres (r), Vacúolos (v).

FONTE: Cedido por Mendonça, et al., 2002.

Por outro lado, a morte celular por necrose ocorre, geralmente, em resposta à injúria severa às células e é caracterizada morfologicamente por inchaço citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular (**Figura 5 A**). Conseqüentemente, ocorre a geração de uma resposta inflamatória, que pode causar injúria e até morte de células vizinhas, ou seja, nesta condição um grande número de células é afetada e lesada ao mesmo tempo e devido ao desencadeamento do processo inflamatório há alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004). A

Figura 5 mostra as diferentes alterações morfológicas que ocorrem nos processos de morte celular por apoptose e por necrose.

Figura 5 - Diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por necrose e apoptose.

A) A necrose é caracterizada pela perda de integridade de membrana plasmática, inchaço seguido de lise celular com extravasamento do conteúdo intracelular e desintegração de organelas. **B)** O processo apoptótico envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação da cromatina, fragmentação celular e formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas.

FONTE: Adaptado de Anazetti; Melo, 2007.

1.7.2 As vias sinalizadoras e o papel das mitocôndrias no processo de apoptose

Evidências atuais sugerem que há várias rotas distintas para a ativação do processo de morte celular por apoptose, essas rotas dependem do estímulo recebido que desencadeará a maquinaria de morte (FULDA; DEBATIN, 2006; SLEE et al., 1999; HENGARTNER, 2000), sendo que, em geral, duas vias distintas podem estar ativas. O sinal para que a célula entre em apoptose muitas vezes vem de fora, e o processo é iniciado através de um receptor de superfície. O fator de necrose tumoral (TNF), produzido por células do sistema imunológico, interage com as células através de receptores específicos TNF-R1 (receptor fator de necrose

tumoral). Estes receptores possuem sítios de ligação ao TNF na face externa da membrana plasmática e um "domínio de morte", de cerca de 80 resíduos de aminoácidos, que passam o sinal de autodestruição através da membrana para proteínas citosólicas como TRADD (domínio de morte associado ao receptor TNF) (GRUSS; DUYSER; HERRMANN, 1996; ASHKENAZI, 2002).

Outro receptor de morte, denominado Fas, também chamado de CD95 ou Apo-1, tem um domínio de morte semelhante, que lhe permite interagir com a proteína citosólica FADD (domínio de morte associada ao Fas), podendo ativar a protease citosólica caspase 8 (KRAMMER, 2000). Esta enzima pertence a uma família de proteases, denominadas caspases, que participam da apoptose. Todas as caspases são sintetizadas como pró-enzimas inativas e somente após a clivagem adquirem atividade proteolítica. O termo caspases é devido ao fato de que todas têm um resíduo de cisteína crítica no sítio ativo, e todas hidrolisam suas proteínas-alvo do lado carboxi-terminal com resíduos específicos de ácido aspártico. As caspases formam, portanto, uma cascata de "proteases de cisteína aspartato-específicas" (STRASSER et al., 2009).

O processo de apoptose iniciado via receptores de morte, também chamado de via extrínseca, requer pró-caspase-8 ou -10 no complexo (FERRI et al., 2001). A caspase-8 quando ativada tem como alvo a caspase-3, que ativa outras caspases efetoras responsáveis pelo início da cascata de morte. A caspase-8 também pode ativar proteínas pró-apoptóticas, como Bid, que atuam sobre as mitocôndrias (KROEMER; REED, 2000).

As mitocôndrias são consideradas as reguladoras da morte celular por apoptose, pois a permeabilização da membrana mitocondrial (MMP) delimita as fronteiras entre a vida e a morte celular. As mitocôndrias são as responsáveis pelo controle da via intrínseca da apoptose, na qual, através da MMP inicia-se a ativação de caspases e outras enzimas catabólicas, além disso, elas também participam da via extrínseca da apoptose, amplificando o processo de auto-destruição (GREEN; KROEMER, 2005; GREEN; REED, 1998).

Durante a transdução de um sinal de apoptose na célula, a MMP culmina em um colapso funcional e estrutural da mitocôndria, que é acompanhado pela dissipação do potencial eletroquímico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), da síntese de ATP, e de um desequilíbrio redox. A mudança estrutural da mitocôndria, indicada pela alteração da matriz e reorganização das cristas mitocondriais, causa a liberação

de proteínas apoptogênicas, localizadas entre as membranas interna e externa da mitocôndria, no citosol e núcleo celular. Proteínas pró-apoptóticas liberadas como consequência da MMP incluem ativadores da cascata de caspases, como o citocromo c, assim como os efetores de morte independentes de caspase, como o fator de indução de apoptose (AIF) e endonucleases G (KROEMER; REED, 2000).

O citocromo c, quando liberado, se liga a dATP, Apaf-1 e pró-caspase-9, formando o complexo apoptossomo. A caspase-9 iniciadora ativada pode então clivar as caspases efetoras subsequentes (-2, -3, -6, -7, -8, -9, e -10). Portanto, a ativação da caspase-9 mediada pelo citocromo c serve como um mecanismo de amplificação de sinais durante o processo apoptótico (LI, 1997; SLEE; ADRAIN; MARTIN, 1999).

A via mitocondrial é freqüentemente ativada em resposta a danos no DNA, envolvendo a ativação de um membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (Bax, Bid). Sinais que geram moléculas pró-apoptóticas e estímulos patológicos convergem para a mitocôndria e induzem à permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP) (**Figura 6**). O local de regulação e execução da MOMP envolve vários tipos de proteínas como as da família Bcl-2, lipídios mitocondriais, proteínas que regulam bioenergeticamente o fluxo metabólico e outros componentes que atuam sobre os poros da membrana (VIEIRA et al., 2000; GREEN; KROEMER, 2005).

Figura 6 - Apoptose via mitocondrial.

Na maior parte das vezes, a morte celular em mamíferos procede através da via mitocondrial, como ilustrado. Os estímulos para a indução de apoptose atuam

predominantemente sobre as membranas das mitocôndrias podendo causar a abertura de poros devido à dissipação do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). O citocromo c ao ser liberado do espaço intermembranar se une as proteínas Apaf-1 e caspase-9 e forma o apoptossomo, que é responsável pela ativação de caspases efetoras da cascata de apoptose.

FONTE: Adaptado de Green; Kroemer, 2005.

Foi demonstrado por Shimizu, Narita e Tsujimoto (1999) que algumas proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak, etc) atuam sobre alguns canais aniônicos voltagem dependente (VDAC), presentes na membrana externa das mitocôndrias, acelerando a abertura destes canais e aumentando a permeabilidade da membrana, permitindo que fatores pró-apoptóticos ativadores das caspases saiam para o citoplasma da célula (**Figura 7**). Por outro lado, eles demonstraram também que uma família de proteínas antiapoptóticas, conhecidas como Bcl-XL fecham estes canais ligando-se diretamente a eles. Enquanto as proteínas Bax e Bak permitem que o citocromo c passe por estes canais VDAC, mantendo-os abertos, as proteínas Bcl-XL evitam que isso ocorra, impedindo a formação de poros na membrana mitocondrial, regulando desta forma o potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e bloqueando a liberação do citocromo c durante eventos de indução de apoptose (MARZO et al., 1998; BOUCHIER- HAYES et al., 2005).

Figura 7- Mecanismos moleculares da permeabilização mitocondrial da membrana externa (MOMP).

Os modelos propostos da MOMP que leva a liberação de citocromo c são representados. **(i)** Poro Bax. Bax ou Bak formam um poro na MOM após a ativação por proteínas como Bid. **(ii)** Abertura do poro PT. Abertura do poro PT permite um influxo de água e íons na matriz causando inchaço da matriz, levando a ruptura da MOM, liberando proteínas do IMS, como o citocromo c.

(MOM) membrana mitocondrial externa; (MIM) membrana mitocondrial interna; (IMS) espaço intermembranar.
 FONTE: Bouchier-Hayes et al., 2005.

Em alguns casos, proteínas como a BH3 (Bid e Bik) podem ter indução apoptogênica, liberando os citocromos c, por outros mecanismos que não necessitem da ligação direta destas aos VDAC. Anticorpos que inibem a VDAC previnem a liberação do citocromo c por ação das Bax, bem como evitam a perda da permeabilidade da membrana mitocondrial. No entanto, isto não é observado com a indução de liberação dos citocromos c pela Bid. Estes anticorpos anti-VDAC também inibem apoptose induzida por agentes químicos indutores de apoptose como os etoposide, paclitaxel, e a estaurosporina (SHIMIZU et al., 2001).

Uma grande variedade de estímulos pode induzir apoptose, dentre eles podem ser destacados os estímulos que causam estresse oxidativo. O mecanismo de indução pode ser via exposição ao peróxido de hidrogênio (IKEDA et al., 1999; MATSURA et al., 1999), ciclização-redox de quinonas ou agentes tiol-alquilantes (SLATER et al., 1995). Uma enorme quantidade de dados suporta o papel do estresse oxidativo no desencadeamento de apoptose (MCCONKEY, 1998), sendo que as vias apoptóticas clássicas envolvem um acúmulo moderado de espécies reativas de oxigênio. Assim como o cálcio, o estresse oxidativo pode inibir ou promover apoptose e até necrose, dependendo da intensidade do estímulo (FERNANDEZ; COTTER, 1994).

Cartier et al., (1994) observaram que, a despeito do fato de proteínas da família Bcl-2 serem muito eficientes em bloquear apoptose em células de mamíferos, elas falham em evitar a morte induzida por baculovírus (AgMNPV) ou induzida por actinomicina-D. Ao contrário do que ocorre com a Bcl-2, a proteína p35, uma potente inibidora de apoptose presente no genoma do baculovírus, evita a morte por apoptose induzida por esta classe de vírus sugerindo que os mecanismos de ação dos dois reguladores podem ser funcionalmente distintos. Devido aos inúmeros mecanismos de ativação da morte por apoptose, a determinação do mecanismo de ação das diferentes proteínas antiapoptóticas, em especial daquelas de amplo espectro de ação, seja inibindo a morte celular por diferentes indutores ou prevenindo esta morte em diferentes tipos celulares, podem ser de alto interesse médico e biotecnológico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo prévio do efeito de uma proteína obtida da hemolinfa de *Lonomia obliqua* com ação antiapoptótica sobre uma das vias clássicas de apoptose, a via mitocondrial, mais especificamente, verificando o efeito desta proteína sobre o potencial elétrico da membrana mitocondrial de células de inseto *Spodoptera frugiperda* da linhagem Sf-9, após a indução de apoptose por agentes indutores químicos e virais.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a ação da hemolinfa e de suas proteínas isoladas sobre o crescimento e a manutenção da viabilidade celular.
- Avaliar a ação da hemolinfa e de sua proteína antiapoptótica isolada sobre o potencial elétrico de membrana mitocondrial a partir da indução de apoptose nas culturas de células de inseto Sf-9 com indutor viral e diferentes indutores químicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem celular, sistema de cultivo celular e vírus

- a) Células da linhagem Sf-9 (*Spodoptera frugiperda*) foram cultivadas à 28 °C em meio Sf-900™ Gibco® (Gibco®, São Paulo, S.P., Brasil). Os cultivos de células Sf-9 foram realizados em frascos de cultivo tipo Schott de capacidade volumétrica de 50 mL e a 100 rpm, contendo 15 mL, ou em microplacas de 6, 12 e 24 escavações.
- b) Células da linhagem Vero (*Cercophitecus aethiops*) foram cultivadas à 37 °C em meio Leibovitz (L-15) da Cultilab® (Cultilab®, Campinas, S.P., Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab®). Os cultivos de células Vero foram realizados em frascos T de 25 cm², contendo 5 mL ou em microplacas de 6, 12 e 24 escavações.

As células *Spodoptera frugiperda* Sf-9 e *Cercophitecus aethiops* Vero, assim como o vírus utilizado como indutor de apoptose, o baculovírus *Anticarsia gemmatilis* Nucleopolyhedrovirus (AgMNPV), foram cedidos pelo Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça, pesquisador científico PqC-VI do Laboratório de Parasitologia e Entomologia do Instituto Butantan, sob direção da Dra. Darci Moraes Barros Battesti, pesquisadora científica PqC-VI do Laboratório de Parasitologia e Entomologia.

3.1.1 Estoque criogênico de células

Um banco de células foi produzido para a realização deste estudo. Células Sf-9 e Vero foram cultivadas em frascos T-75 até atingir a concentração de 10^7 células por mL. As células em fase exponencial foram centrifugadas à 750G por 5 minutos e foram ressuspensas em meio de congelamento, contendo 70% de meio SF-900 (para as células Sf-9) ou L-15 (para as células Vero), 20% de soro fetal bovino e 10% de glicerina esterilizada. A suspensão foi aliquotada em criotubos (Nunc) com volume de 1,5mL. Os criotubos foram colocados em freezer -20 °C por 2 horas e,

posteriormente, em freezer -80 °C por 24 horas. Após este período, os criotubos foram transferidos e mantidos em nitrogênio líquido (-121 °C).

3.1.2. O baculovírus

Foram utilizados neste estudo baculovírus *Anticarsia gemmatalis nuclear polyhedrosis vírus* (AgMNPV) selvagem. A **Figura 8** apresenta fotos de células Sf-9 normais (A) e infectadas com baculovírus selvagem (B).

Figura 8 - Células de inseto *Spodoptera frugiperda* da linhagem Sf-9 normais e infectadas.

A) Foto de células Sf-9 normais em microscopia óptica (Barra = 10μm). **B)** Foto de células Sf-9 infectadas por baculovírus AgMNPV apresentando vários poliedros em microscopia óptica (Barra = 10μm).

FONTE: Cedido por Mendonça, R. Z. (comunicação pessoal).

O baculovírus selvagem utilizado neste trabalho foi previamente titulado através da metodologia da diluição final, conforme descrito por Reed e Muench (1938) (detalhado no Apêndice A). A infecção, tanto para obtenção do estoque viral, quanto para os ensaios onde foi utilizado como indutor de apoptose, foi realizada de acordo com a seguinte metodologia: Células Sf-9, em fase exponencial de crescimento, foram infectadas com baculovírus selvagem em multiplicidade de infecção (MOI) 1 ou 5 (multiplicidade de infecção - razão entre as partículas virais e o número de células presentes na cultura).

Para que as culturas fossem infectadas com o MOI acima definido, o volume de inóculo viral a ser utilizado nas culturas foi calculado através da equação a seguir, na qual a MOI é definida como multiplicidade de infecção (razão entre as partículas virais e o número de células presentes na cultura) (FRESHNEY, 2005).

$$\text{inóculo viral} = \frac{\text{moi} * \text{n}^{\circ} \text{ de células totais}}{\text{título viral}}$$

Amostras dos cultivos infectados foram coletadas para a determinação do título viral como descrito por Reed e Muench (1938). Todos os cultivos infectados foram mantidos a 28 °C. Nos experimentos os cultivos foram infectados com 1 MOI.

3.1.2.1 Estoque viral

Foi criado um lote-estoque para o baculovírus selvagem utilizado nos diferentes experimentos. Os estoques foram obtidos a partir de um cultivo de células Sf-9 (10^6 células/mL), mantido em suspensão, e infectado com 5 MOI do vírus e deixados em cultura por 5 dias. Após este período o sobrenadante foi colhido e centrifugado para a retirada de células residuais, aliquoteado em tubos e estocados a 4 °C. Os estoques virais foram titulados como descrito por Reed e Muench (1938) conforme detalhado no Apêndice A. Segundo esta metodologia, o título viral é expresso em TCID₅₀/mL (*50% Tissue culture infectious dose*), significando que a titulação do vírus disperso no sobrenadante da cultura é definida pelo inverso da diluição da amostra que causa alteração (efeito citopático) em pelo menos 50% das células da cavidade da microplaca utilizada (TCID₅₀ por mililitro).

3.2 Obtenção de hemolinfa

A hemolinfa foi obtida de lagartas de *Lonomia obliqua* (família *Saturnidae*), do 6º instar de desenvolvimento, ou seja, na última etapa de desenvolvimento da lagarta. A hemolinfa foi coletada do extravasamento obtido após a retirada das espículas (cerdas urticantes), tomando-se cuidado para não haver mistura da hemolinfa com quaisquer outros fluidos da lagarta, procedimento realizado pelo colaborador Roberto Henrique Pinto Moraes MSc, pesquisador científico PqC-V, do Laboratório de Parasitologia e Entomologia do Instituto Butantan.

Após a coleta, a hemolinfa foi centrifugada a 1.000G por 10 minutos, tratada à 60 °C por 30 minutos e filtrada em membrana esterilizante de nitrocelulose, de porosidade de 0,22 µm. O material obtido foi denominado Hb (hemolinfa bruta de *Lonomia obliqua*). Alíquotas deste material foram utilizadas em todas as etapas do trabalho. A Hb, após o tratamento descrito acima, foi mantida à -4 °C e utilizadas nas cromatografias e como suplemento das culturas na concentração de 1% (v/v).

3.2.1 Citotoxicidade

A hemolinfa inativada foi testada quanto sua toxicidade às células. Para isto, foram adicionados 0,5, 1, 2, 5 ou 10% de Hb aos cultivos de células Vero, com relação ao volume final de cultivo, sendo 300 mg a concentração de proteínas totais. Células Vero, ao atingirem a densidade aproximada de 10⁵ células por mL, foram cultivadas em placas de 6 poços em meio L-15 suplementado com 10% de SFB. Após obterem a confluência (24 horas), foram adicionadas aos cultivos as diferentes concentrações de Hb. Foram retiradas diariamente amostras dos cultivos para determinação da concentração e viabilidade celular. A morfologia dos cultivos foi acompanhada através de observação diária em microscópio óptico invertido em aumento de 100x e 200x. No final do cultivo, os poços foram corados com 0,25% de cristal de violeta e fotografados. As células Vero foram escolhidas para realizar esse procedimento pela facilidade de manejo e por ser um tipo celular que cresce aderente sob as placas, tornando mais fácil o processo de coloração.

3.3 Fracionamento da hemolinfa por cromatografia líquida

Para o fracionamento da hemolinfa foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta resolução AKTA purifier™ (Amersham Pharmacia Biotech, São Paulo, S.P., Brasil) composto por duas bombas, leitor de luz ultravioleta, programador – software Unicorn 4.0 e coletor de frações Frac 900™ (Amersham Pharmacia Biotech) acoplado.

Uma amostra de 5 mL de Hb, correspondente à 100 mg de proteínas totais, foi submetida à cromatografia em coluna de gel filtração Sephacryl™ *High Resolution* (HR) S-200 (GE LifeSciences, São Paulo, S.P., Brasil), de 200 mL de

volume (coluna de 1,1 cm x 50 cm). A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM NaCl 150 mM pH 8,0. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão, com fluxo de 1 mL por minuto, sendo coletadas frações de 4 mL por tubo coletor. O perfil de eluição protéica foi monitorado por leitura de absorbância em 280 nm.

Iniciar um processo de purificação através de colunas de gel filtração é relevante para que, como um estudo inicial, seja revelado o perfil de pesos moleculares das diferentes proteínas que compõem a hemolinfa (OURTH, 2004). As frações obtidas através desse processo foram analisadas quanto à atividade desejada e, em seguida, as frações que apresentaram o efeito antiapoptótico foram reunidas em um único *pool* de proteínas, e utilizadas para determinação das bandas protéicas através de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, dosagem da concentração protéica e como suplemento dos cultivos celulares induzidos ou não a apoptose, conforme descrito a seguir.

Para melhor purificação das proteínas, o *pool* de proteínas que apresentou atividade antiapoptótica, foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna Resource™Q (GE LifeSciences), de 1 mL de volume e capacidade para até 25 mg de proteínas por mL. Antes de ser aplicado à coluna, o *pool* foi dialisado em sacos de diálise com tamanho nominal de corte de 12 a 16 kDa, de celulose regenerada (Interlab S.A., São Paulo, S.P., Brasil), por 10 horas, sob agitação, contra 2 litros de tampão Tris 10 mM, trocados 3 vezes. A coluna Resource™Q foi equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0, onde foi aplicado 0,5 mL de amostra, correspondendo a aproximadamente 1 mg de proteína. A cromatografia foi realizada com um fluxo de 0,7 mL por minuto e coletadas frações de 0,5 mL por tubo coletor. A eluição das proteínas foi realizada por gradiente de 0 a 100% de NaCl até a concentração final de 1M. As soluções utilizadas neste processo foram Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e Tris-HCl 20 mM NaCl 1M pH 8,0. A eluição das proteínas foi monitorada por leitura de absorbância em 280 nm. As frações protéicas obtidas foram utilizadas nos testes de atividade antiapoptótica em cultivos e aplicadas à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE para determinação das bandas protéicas. A fração que apresentou a atividade antiapoptótica foi denominada de Frp.

3.4 Procedimentos analíticos

3.4.1 Concentração e viabilidade celular

O crescimento e morfologia celular foram monitorados através de microscópio óptico invertido *Olympus CK2* em aumento de 200x. A concentração celular foi determinada utilizando um hematocítmetro e a viabilidade celular foi determinada segundo o método de exclusão celular por azul de tripan, que tem como fundamento o fato que células mortas apresentam falhas na membrana e por isso absorvem o corante, ficando azuis, enquanto que as células vivas impedem sua entrada, permanecendo descoradas (FRESHNEY, 2005).

Também foi verificado o efeito da proteína antiapoptótica sobre a viabilidade celular após a infecção das células. Para isso, os cultivos de células Sf-9 foram tratados por 1 hora com 1% (v/v) de Hb ou Frp. Após este período as células foram infectadas com 1 MOI de baculovírus. Amostras foram tiradas diariamente com o objetivo de verificar o efeito antiapoptótico da Hb e Frp, determinando-se a viabilidade celular também utilizando o método de exclusão celular por azul de tripan.

3.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

As eletroforeses em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), foram realizadas conforme descrito por Laemmli (1970). Foram utilizados 10 µL das amostras da hemolinfa bruta, das frações obtidas por cromatografia de gel filtração e da subfração que apresentou atividade antiapoptótica, obtida após cromatografia em troca iônica.

Foram preparados géis de 0,75 mm de espessura, contendo 15% de poliacrilamida no gel de separação e 4% de poliacrilamida no gel de empilhamento, montados em cuba vertical de eletroforese modelo mini-protean™ Bio-Rad (Bio-Rad S.A., São Paulo, S.P., Brasil). As imagens foram capturadas e analisadas utilizando um sistema de coleta de imagem “AlphaDigiDoc RT 2”, Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich S.A., St. Louis, M.O., USA).

Os géis foram preparados da seguinte forma:

- a) Gel de Separação (15%):** Foram utilizadas para a preparação do gel de separação: 5,0 mL de solução de poliacrilamida (acrilamida 30% bis-acrilamida 0,8%), 2,5 mL de tampão Tris 1,5 M (pH 8,8), 0,1 mL de SDS 10% - Sigma, 0,1 mL de persulfato de amônio 10% – Serva (Serva S.A., São Paulo, S.P., Brasil), 0,004 mL de Temed (N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine) Merk (Merk, S.A., Rio de Janeiro, R.J., Brasil) e 2,3 mL de água destilada. Após agitação suave, a mistura foi distribuída nas placas de vidro;
- b) Gel de empilhamento (4%):** Após a polimerização do gel de separação, foi preparado o gel de empilhamento, contendo 1,0 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 amônio (Serva) 10%, 0,006 mL de Temed (Merck), e 4,1 mL de água destilada. A solução resultante foi aplicada sobre o gel de separação e, em seguida foi colocado um pente para a formação de poços que possibilitaram a aplicação das amostras após a polimerização do gel;
- c) Preparo das amostras:** As amostras foram diluídas em 10 μ L de uma solução com mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 2%, e glicerol 10%. A seguir, foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos, aplicadas em alíquotas de 12 μ L nos géis de eletroforese, e foram submetidas a voltagem constante de 100 Volts à temperatura ambiente por aproximadamente 90 minutos em cuba vertical contendo tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 3,5 mM).

3.4.3 Eletroforese bidimensional (2-D)

A eletroforese bidimensional é um poderoso método de separação de misturas complexas de proteínas. Esse método e suas melhorias são amplamente usados para a análise proteômica. Após a obtenção das proteínas das células, elas são separadas com duas propriedades: capacidade de protonação, em intervalos definidos de pH, através do ponto isoelétrico (PI) e pela massa molecular. Com essas duas propriedades, várias proteínas são separadas em gel de poliacrilamida. Para a visualização das proteínas o gel é submetido a uma coloração. Existem

diversas colorações que variam de acordo com a sensibilidade para detecção das proteínas (HEALTHCARE GE, 2004; HIRSCH et al., 2004).

Para a análise da expressão de proteínas, células Vero foram tratadas por 1 hora com Hb de *Lonomia obliqua*. Após esse período, as células foram coletadas, lisadas através da adição do tampão de extração de proteínas 2-D Protein Extration Buffer – II (GE Healthcare) contendo um inibidor de protease (Protease Inhibitors Mix, GE Healthcare) (total de 0,6 mL). As células lisadas foram então centrifugadas a 1.000G por 10 minutos, foi então retirado o sobrenadante e descartado o pellet formado com os restos celulares.

Para realizar a primeira dimensão da eletroforese bidimensional (2-D), denominada isofocalização ou focalização isoeletrica, 60 µg de cada amostra foram aplicados sobre as fitas, referidas como IPG strips (Immobiline Dry Strip™, com gradiente de pH linear 3-10, 13 cm - GE Healthcare) juntamente com 0,2 mL do tampão de rehidratação De Streak Rehydration Solution (GE Healthcare) e 0,005 mL de IPG-Buffer, PH 3-10 (GE Healthcare). A focalização isoeletrica é um método eletroforético que separa as proteínas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI), esse procedimento foi realizado em um aparato horizontal Ettan IPGphor™ (GE Healthcare).

Após a focalização isoeletrica as strips foram submetidas a um banho redutor em uma solução contendo 0,1g de ditioneitol (DTT) e 10 mL de solução tampão de equilíbrio SDS (72,1g de uréia; 10 mL de tampão Tris-HCl (pH 8); 69 mL de glicerol; 4,0g de SDS (Sigma) 10%; 0,4 mL de solução 1% de azul de bromofenol, 200 mL de água bidestilada q.s.p), permanecendo em agitação por 15 minutos. Após esse período, as strips foram submetidas a um banho quelante em uma solução contendo 0,25g de iodoacetamida e 10 mL da mesma solução tampão de equilíbrio SDS utilizada no banho redutor. As strips permaneceram em agitação por 15 minutos.

Após esse período, as strips foram aplicadas sobre o gel contínuo de poliacrilamida SDS-PAGE (12,5%), preparado com 41,7 mL de solução de poliacrilamida (acrilamida 30% bis-acrilamida 0,8%), 25 mL de tampão Tris 1,5 M (pH 8,8), 1 mL de SDS (Sigma) 10%, 1 mL de perulfato de amônio (Serva) 10%, 0,11 mL de Temed (Merk) (N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine) e 31,19 mL de água destilada. Após agitação suave, a mistura foi distribuída nas placas de vidro. As eletroforeses em gel de poliacrilamida foram realizadas em cuba vertical contendo tampão de corrida (30,3g de Tris, 144,1g de glicina, 10g de SDS, água

bidestilada q.s.p 10 L) e submetidos a uma corrente de 30mA, por 1 hora e em seguida foi aumentada a amperagem para 80mA por 5 horas. O peso molecular de calibração utilizado foi o PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 - 170 kDa) (Fermentas). Para a análise das imagens, cada gel foi escaneado em um scanner de alta definição (imagescanner III™). As imagens de cultivos de células controle e de cultivos de células tratados com hemolinfa obtidas foram comparadas qualitativamente e quantitativamente para determinação da expressão das proteínas.

3.4.4 Métodos de coloração dos géis de poliacrilamida uni e bidimensional

- a) *Coloração com Coomassie-Blue*: Após a migração das proteínas, a coloração dos géis foi feita com Plus One Coomassie Tablets, PhastGel Blue R-350™ (GE Healthcare). Cada pastilha utilizada foi dissolvida em 80 mL de água destilada, 120 mL de metanol e filtrada em papel filtro. Em seguida, uma parte desta solução foi misturada a nove partes de metanol: ácido acético: água destilada (3:1:6). Os géis foram colocados em 100 mL de solução corante coomassie blue *overnight*. Após esse período os géis foram retirados da solução corante e colocados na solução descorante (metanol 100 mL, ácido acético glacial 70 mL, 1000 mL de água destilada q.s.p). Os géis foram deixados nessa solução em agitação, trocando várias vezes o descorante até a evidenciação das bandas;
- b) *Coloração dos géis por prata*: Após a migração das proteínas, a coloração dos géis foi feita com nitrato de prata. Os géis foram pré-fixados por 2 horas, sob agitação, em solução fixadora (50% metanol, 12% ácido acético e 0,05 mL de formaldeído, 100 mL de água destilada q.s.p). Posteriormente, foram lavados em etanol 30% por 5 minutos. Em seguida, os géis foram colocados em solução de tiosulfato de sódio (40 mg de tiosulfato de sódio em 200 mL de água destilada) por 5 minutos e lavados duas vezes com água destilada. Os géis foram, então, incubados em solução de nitrato de prata (200 mg de nitrato de prata em 100 mL de água destilada e 0,075 mL de formaldeído 37%) por 10 minutos, lavados com água destilada por 1 minuto, e logo após, colocados em solução reveladora (6 g de carbonato de sódio; 2 mL da solução de tiosulfato;

0,05 mL de formaldeído 37%, 250 mL de água destilada q.s.p.) mantendo sob agitação até a visualização das bandas de proteínas no gel. Para finalizar a reação, adicionou-se uma solução 50% metanol, 12% ácido acético.

Em todas as eletroforeses unidimensionais foram utilizados padrões de peso molecular PageRuler™; Prestained Protein Ladder (Fermentas) (10-170 kDa) ou Amersham (14- 94 kDa). As imagens dos géis foram capturadas em um scanner Epson Perfection 610 e trabalhadas no programa Microsoft® Paint 2007.

3.4.5 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas presente na Hb e na Frp foi determinada pelo Kit BCA Protein Assay Reagent™ (bicinchoninic acid) (Pierce). Para a determinação da concentração de proteínas, foi realizada uma diluição seriada iniciada com um volume de 25 µL de cada uma das amostras e padrões. Foi adicionado o mesmo volume de solução de BCA, que foi preparada no momento do uso. As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. A leitura de absorbância foi realizada em 562 nm e as concentrações foram determinadas utilizando uma curva padrão de BSA (proteína albumina do soro bovino) nas mesmas condições do ensaio.

3.4.6 Digestão protéica

A banda protéica, obtida do gel de eletroforese SDS-PAGE, que apresentou atividade antiapoptótica foi cortada do gel, reduzida a pequenos fragmentos e colocados em um microtubo eppendorf. A seguir o material foi lavado duas vezes com 0,5 mL de uma solução de metanol 50%, ácido acético 5% em água, e mantido por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi retirada e o gel desidratado duas vezes com 0,2 mL de acetonitrila 100% e mantida no escuro por 5 minutos. A acetonitrila residual foi eliminada em speed-vac.

O material foi reduzido com 0,03mL de ditioneitol (DTT) 10 mM (1,5 mg em 1 mL de bicarbonato de amônio 100 mM), por 30 minutos à temperatura ambiente, centrifugado para eliminação do DTT e foi, então, realizada a alquilação com 0,03mL de iodoacetamida (IAA) 50mM (9 mg de IAA em 1 mL de bicarbonato de amônio 100 mM), por 30 minutos, à temperatura ambiente. O IAA foi eliminado após

centrifugação e o gel lavado com 0,1 mL de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos e, após a remoção desta solução, o gel foi desidratado com 0,2 mL de acetonitrila (100%), por 5 minutos à temperatura ambiente. A acetonitrila foi retirada e o gel reidratado com 0,2 mL de bicarbonato de amônio (100 mM) por 10 minutos. O bicarbonato foi eliminado após centrifugação e o gel foi reidratado com 0,2 mL de acetonitrila (100%) por 5 minutos à temperatura ambiente. A acetonitrila foi retirada e o passo repetido, sendo eliminado qualquer resíduo de acetonitrila em speed-vac. A seguir, foi adicionado 0,05 mL de uma solução com tripsina e bicarbonato de amônio (2% tripsina em bicarbonato de amônio 50 mM gelado), por 30 minutos, em banho de gelo. A tripsina foi eliminada por centrifugação e foi adicionado ao material 0,02 mL de bicarbonato de amônio 50 mM, mantendo *overnight* à 37 °C.

Após a retirada de toda a tripsina, as proteínas foram extraídas com 0,01 mL de ácido fórmico (5% em água) por 10 minutos à temperatura ambiente, a suspensão foi centrifugada e ao sobrenadante coletado foi adicionado 0,012 mL de ácido fórmico (5% em acetonitrila 50%), por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante coletado após uma centrifugação foi então seco em speed-vac por 40 minutos.

3.4.6.1 Espectrometria de massa e obtenção da sequência de aminoácidos da região C-terminal da proteína antiapoptótica

O material digerido foi ressuspenso em 0,015 mL de ácido trifluoroacético (0,1%) e analisado por espectrometria de massa em um MALDI-Q-TOF Premier™ (Waters), no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS). As amostras foram conservadas a -20 °C até o momento do uso. As sequências obtidas foram analisadas e comparadas as sequências depositadas no *GenBank*.

3.5 Procedimentos para análises de apoptose celular

3.5.1 Determinação do efeito antiapoptótico da hemolinfa e da proteína purificada (Frp)

Para avaliar a morte celular nos cultivos de células induzidas a apoptose e a proteção exercida pela proteína antiapoptótica da hemolinfa, cultivos de células Sf-9 foram tratados por 1 hora com 1% (v/v) de Hb ou Frp. Após este período as células

foram induzidas a apoptose através da infecção com 1 MOI de baculovírus selvagem (*Anticarsia gemantalis*). Amostras das culturas foram coletadas diariamente para contagem de células, com o objetivo de verificar o efeito antiapoptótico da Hb e Frp, determinando-se a viabilidade celular e verificando-se a apoptose nas populações celulares em Facs após marcação com Hoechst 33324/ PI.

Também foram utilizados como indicadores de morte celular os fluorocromos laranja de acridina (100 µg/mL) em conjunto com o iodeto de propídio (100 µg/mL).

3.5.2 Participação da mitocôndria no processo de apoptose

A participação da mitocôndria durante a morte celular por apoptose induzida e o efeito protetor da Hb foram determinados através da sinalização da perda de potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), utilizando células Sf-9, onde a apoptose foi induzida com 1 MOI de baculovírus selvagem (indutor viral), H₂O₂ ou t-BHP (indutores químicos). A identificação do $\Delta\Psi_m$ foi realizada em FACs após marcação com DiOC₆(3) (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide) na concentração de 20 µM ou em microscópio de fluorescência após marcação com JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl benzimidazolyl carbocyanine iodide) e Hoechst 33324 nas concentrações de 2 µM.

3.5.2.1 Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células Sf-9 por DiOC₆(3)

a) Após indução viral: Células Sf-9, em fase exponencial (1 x 10⁶ células/mL) foram tratadas com 1% (v/v) de Hb ou com Frp. Após uma hora de contato os cultivos foram infectados com 5 MOI de baculovírus selvagem. Amostras das culturas foram coletadas diariamente para contagem de células, viabilidade celular e quantificação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em FACs, após marcação com DiOC₆(3) 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide, na concentração de 20 µM e Iodeto de propídio, na concentração de 1 µg/mL por 20 minutos. A determinação da proteção celular foi realizada por citometria de fluxo (FACs - FACSort Becton Dickinson -Ar laser), a 488 nm (excitação) e 620 nm (emissão). Dez mil células foram analisadas;

b) Após tratamento químico: A determinação do potencial de membrana mitocondrial em células Sf-9 também foi realizada após indução química por t-BHP (tert-butyl hydrogen peroxide) nas concentrações finais de 125, 250, 500, 750, 1000 e 1500 μM e H_2O_2 nas concentrações de 200, 300, 400, 600, 800, 1.000 e 1.200 μM . Para isso, células em fase exponencial foram tratadas com 1% (v/v) de Hb ou Frp, ficando em contato por 1 hora. Após este período foram adicionados os indutores químicos, ficando em contato por 4 horas ou *overnight*. Após este período as células foram marcadas com DiOC₆(3) (20 μM) e iodeto de propídio (1 $\mu\text{g/mL}$) por 20 min e aplicadas a um citômetro de fluxo (FACs - FACSort Becton Dickinson -Ar laser™) a 488 nm (excitação) e 620 nm (emissão). Dez mil células foram analisadas.

O DiOC₆(3) fluoresce em verde quando o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é alto, perdendo esta emissão quando o $\Delta\Psi_m$ é baixo. O iodeto de propídio (PI) fluoresce em vermelho, quando a célula perde a integridade da membrana plasmática.

3.5.2.2 Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células SF-9 por JC-1

Para a determinação do efeito da hemolinfa na proteção de apoptose induzida por t-BHP ou H_2O_2 , células Sf-9 foram cultivadas em microplacas de 12 escavações. Após semi-confluência as células foram tratadas com 1% (v/v) de Hb ou Frp com atividade antiapoptótica. Após 1 hora de contato as células foram tratadas com 250, 500, 750, 1000 ou 1500 μM de t-BPH ou com 200, 300, 400, 600, 800 ou 1000 μM de H_2O_2 . Os cultivos foram mantidos em estufa por 4 horas ou *overnight* e depois deste período as células foram lavadas com PBS e tratadas com Hoechst 33324 (2 μM) e o fluorocromo JC-1 (2 μM). O JC-1 é um marcador que mede o potencial de membrana das mitocôndrias nas células, e sua emissão foi analisada em microscópio de fluorescência. Células com mitocôndria com alto potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) (normais) são coradas em vermelho e as células com a mitocôndria com baixo potencial ($\Delta\Psi_m$) (com perda de permeabilidade de membrana) são coradas em verde (**Figura 9**). Células normais apresentam núcleo

homogêneo corado em azul (Hoechst) e células apoptóticas apresentam o núcleo fragmentado também corado em azul.

Figura 9 - Representação da emissão do JC-1.

A) Esquema da emissão do JC-1, onde o corante se acumula nas mitocôndrias de células saudáveis como agregados, que fluorescem na cor vermelha. Após o início da apoptose, devido ao colapso no potencial mitocondrial, o corante JC-1 não pode mais se acumular nas mitocôndrias e permanece no citoplasma em sua forma monomérica que fluoresce verde. **B)** Fotos de microscopia de fluorescência mostrando os dois estágios. Células apoptóticas, mostrando fluorescência verde, são facilmente diferenciadas das células saudáveis que apresentam fluorescência vermelha. A distribuição diferencial das formas verde e vermelho do corante é facilmente analisada, pois o corante é altamente específico e sensível.

FONTE: cedido por Mendonça, R. Z. (comunicação pessoal).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da Hemolinfa sobre as células

4.1.1 Determinação da citotoxicidade da hemolinfa

A citotoxicidade da hemolinfa foi testada em células Vero, com densidade aproximada de 10^5 células/mL, forma cultivadas em placas de 6 poços até atingirem confluência. Foram adicionadas as diferentes concentrações de Hb nos cultivos e a viabilidade celular foi acompanhada através da observação diária em microscópio óptico invertido. A **Figura 10 (A e B)** mostra os resultados dos testes de citotoxicidade que foram realizados adicionando diversas concentrações de hemolinfa bruta inativada (0.5, 1, 2, 5 e 10%) sobre os cultivos de células Vero.

A hemolinfa mostrou-se ser citotóxica apenas em concentrações superiores a 5%, demonstrando que sua aplicação nos cultivos em menores quantidades é totalmente viável. Em concentrações inferiores não foi observada morte celular significativa. No 6º dia de cultivo, as células foram lavadas com PBS e coradas com 0,25% de cristal violeta (**Figura 10 B**).

Figura 10 - Determinação da citotoxicidade da hemolinfa em células Vero.

A

B

Células Vero tratadas com diferentes concentrações de hemolinfa (0.5, 1, 2, 5 e 10%) foram coradas para determinação da viabilidade celular em cada momento de cultivo. **A)** Gráfico de porcentagem de viabilidade celular (coloração com azul de tripan); e **B)** Placa de cultivo celular com as diferentes concentrações de hemolinfa, corada no 6º dia com cristal violeta.

FONTE: Martins, L. M. 2011.

4.1.2 Análise do efeito da hemolinfa sobre a cinética de crescimento, a concentração e a viabilidade celular

A **Figura 11** mostra as curvas de crescimento referentes ao ensaio feito para verificar o efeito da hemolinfa na cinética de crescimento de células Vero. Foram realizados cultivos em monocamada de células Vero em meio L-15 com 10% de SFB, onde a hemolinfa de *L. obliqua* foi inoculada na proporção de 1% com relação ao volume final do cultivo (aproximadamente 300 µg de proteína). Como pode ser observado, até aproximadamente o 5º dia de cultivo, as curvas de crescimento celular do cultivo controle (células Vero em meio L-15 com 10% de SFB) e do cultivo em presença de 1% (v/v) de hemolinfa apresentaram perfil similar. A partir do 7º dia de cultivo, são atingidas concentrações celulares de $2,9 \times 10^5$ células/mL no cultivo em presença de hemolinfa, e o cultivo controle atinge $2,4 \times 10^5$ células/mL. Ao observar a **Figura 11**, pode-se verificar que, na fase final de cultivo, ocorre uma queda mais acentuada na viabilidade celular no cultivo controle, quando comparado ao cultivo tratado com 1% de hemolinfa.

Figura 11- Cinética de crescimento de células Vero

Células Vero foram tratadas com 1% (v/v) de hemolinfa (cél+HB) ou não (controle) conforme indicado na legenda do gráfico, amostras dos cultivos foram coletadas e coradas com azul de tripan para determinação da concentração de células. Os valores representam a média de dois experimentos independentes.
 FONTE: Martins, L. M. 2011.

A **figura 12** mostra o resultado de experimento realizado com células Sf-9, iniciado com 10^5 células/mL, onde amostras das culturas foram coletadas diariamente e contadas através do método de exclusão por azul de tripan. O gráfico apresentado nos mostra o número de células viáveis encontradas ao longo dos dias de cultivo. Para esse experimento foram contadas as amostras de cultivo de células Sf-9 em condições normais e cultivos de células Sf-9 com adição de 1% (v/v) de Hb ou 1% (v/v) de fração purificada.

Figura 12- Porcentagem de células Sf-9 viáveis em cultura

Células Sf-9 foram tratadas com 1% (v/v) de hemolinfa bruta (Hb) (Laranja), fração purificada da hemolinfa (Verde) e controle (células sem Hb) (Azul).
 FONTE: Martins, L. M. 2011.

Também foram realizados testes do efeito da Hb sobre o crescimento de células Sf-9 em cultivos infectados pelo baculovírus *Anticarsia gemantalis*. Para isso, culturas de células Sf-9 foram infectadas com 1 MOI de vírus no dia 2 e amostras do sobrenadante dos cultivos, com ou sem tratamento com hemolinfa, foram obtidas diariamente e a viabilidade celular foi determinada. Esta infecção foi realizada antes, após ou ao mesmo tempo da adição da hemolinfa. Como pode ser observada na Figura 13, a infecção reduz o crescimento celular. Isso se deve ao fato de que células infectadas param de se replicar. As células infectadas irão reduplicar o vírus, que, uma vez liberado no sobrenadante, irá infectar as demais células (infecção secundária), as quais também cessarão o crescimento. Após esta etapa as células morrerão por lise (necrose) ou por apoptose (induzida pelo vírus). Cultivos infectados e tratados com hemolinfa, após um tempo, também cessam o crescimento celular. No entanto, como a hemolinfa bruta possui uma proteína com ação antiapoptótica, a morte celular é evitada por algum tempo, permitindo que o cultivo se mantenha viável por mais alguns dias. Como pode ser observado no gráfico da **Figura 13**, em todos os cultivos tratados com hemolinfa houve um aumento no número de células bem como um prolongamento da viabilidade celular.

Figura 13- Número de células Sf-9 viáveis em diferentes tempos de adição de hemolinfa.

Cultivos de células Sf-9 foram realizados em frascos schott contendo 15 ml de meio Sf-900, mantidos à 28 °C e a 100 rpm. O cultivo foi iniciado com 3×10^5 células/mL. Amostras foram obtidas diariamente e o número de células viáveis foram determinadas após coloração com azul de tripan. As células foram tratadas no 2º dia com 1% (v/v) de hemolinfa 1 hora antes da infecção, 1 hora

após a infecção ou com uma mistura de vírus e hemolinfa. As células foram infectadas com 1 MOI de baculovírus *Anticarsia gemmatilis*.
 FONTE: Martins, L. M. 2011

4.2 Purificação da hemolinfa

4.2.1 Cromatografia de gel filtração em coluna “Sephacryl S200”

Foi realizada a purificação da hemolinfa bruta visando determinar a proteína responsável pelo efeito antiapoptótico. Para iniciar a purificação desta proteína, 5 mL da hemolinfa foram aplicados em uma coluna de gel filtração (Sephacryl S200).

O perfil cromatográfico obtido através da cromatografia de gel filtração está apresentado na **Figura 14**. As frações foram testadas em cultivo de células Sf-9 buscando identificar a fração com a atividade desejada. As frações 370 a 490 foram as frações que apresentaram atividade, e em seguida foram reunidas formando um único pool de proteínas.

Figura 14 - Cromatografia de gel filtração (Sephacryl 200) da hemolinfa de *Lonomia obliqua*.

A purificação foi realizada em um ÄKTA purifier com um fluxo de 2 mL/min, sendo obtidas frações de 4 mL cada. A eluição foi realizada com uma solução de Tris (20 mM) e NaCl (150 mM).
 FONTE: Martins, L. M. 2011.

4.2.2 Cromatografia de troca iônica em coluna “Resource Q”

O pool de proteínas que foi coletado da cromatografia de gel filtração e que apresentou atividade antiapoptótica, foi concentrado e, então, o material foi aplicado a uma coluna de troca iônica Resource Q. Com base nos resultados obtidos anteriormente, foi coletada a fração que não se ligou à coluna. Esta fração, com atividade antiapoptótica, apresentou um ponto isoelétrico de 6.7. Como sua carga é quase neutra, ela não se ligou a coluna, separando-se facilmente das demais proteínas presentes na hemolinfa e que são eletricamente carregadas. Na **Figura 15** apresentamos o perfil cromatográfico e na **Figura 16** apresentamos o gel de poliacrilamida SDS-PAGE mostrando o perfil eletroforético da hemolinfa total, da fração semi-purificada em cromatografia de gel filtração e da proteína purificada em cromatografia de troca iônica.

Figura 15 - Cromatografia de troca iônica (Resource Q)

Cromatografia do pool de proteínas que apresentou a atividade antiapoptótica coletada da cromatografia de gel filtração. A purificação foi realizada em um ÄKTA purifier com um fluxo de 2 mL/min, sendo obtidas frações de 0,5 mL. A eluição foi realizada com uma solução de Tris (20 mM) e com um gradiente de 0 a 100% de NaCl até a concentração final de 1M.

FONTE: Martins, L. M. 2011.

Figura 16 - Gel de eletroforese SDS-PAGE

Gel de 12% da hemolinfa bruta **(1)**, da fração semi-purificada em cromatografia de gel filtração (fração 370 - 490) **(2)** e da fração purificada obtida em cromatografia de troca iônica **(3)**. A primeira coluna corresponde ao peso molecular de calibração (Fermentas). O gel foi revelado com coomassie blue.
 FONTE: Martins, L. M. 2011.

4.3 Efeito da hemolinfa sobre a apoptose

As características de apoptose foram evidenciadas através de microscopia de fluorescência pela utilização dos fluorocromos laranja de acridina (100 µg/mL) e iodeto de propídio (100 µg/mL). Para realizar esse experimento cultivos de células Sf-9 foram iniciadas com 5×10^5 células/mL, mantidos a 29 °C e a 100 rpm, os cultivos foram mantidos na presença ou na ausência de 1% (v/v) de fração purificada da hemolinfa. Após 4 dias de cultivo, amostras foram coletadas e coradas com os fluorocromos descritos acima e, então, observadas em microscópio de fluorescência no aumento de 20X. Na **Figura 17 A** podemos observar que a maioria das células com a adição da fração purificada permaneceu viável, o que não ocorreu na **Figura 17 B**, cujas células estavam sem a presença da fração e apresentaram características de células em processo de apoptose. Para melhor observação dos diferentes estágios das células (viável, necrótica e apoptótica) uma terceira foto foi tirada com um aumento de 40X (**Figura 17 C**).

Figura 17 – Microscopia de fluorescência de células Sf-9.

Células Sf-9 na presença **(A)** ou ausência **(B)** da fração purificada da hemolinfa de *Lonomia obliqua*. As culturas foram iniciadas com 5×10^5 células/mL e mantidas a 29 °C. Amostras foram coletadas no 4º dia, coradas com laranja de acridina e iodeto de propídio e observadas em microscópio de fluorescência. **(C)** Células Sf-9 em diferentes estágios, com características de célula viável (V), necrótica (Nc) e apoptótica (Ap). (A e B aumento de 20X e C aumento de 40X).
FONTE: Martins, L. M. 2011.

A **figura 18** mostra a porcentagem de células apoptóticas dos cultivos descritos acima, onde as amostras foram coletadas diariamente e contadas através do microscópio de fluorescência.

Figura 18 - Porcentagem de células Sf-9 apoptóticas em culturas tratadas ou não com 1% (v/v) da fração purificada da hemolinfa.

Amostras das culturas foram coletadas diariamente e foram contadas as células apoptóticas presentes na amostra.
FONTE: Martins, L. M. 2011.

Os vírus em geral são eficientes indutores de morte celular por apoptose. No gráfico apresentado na **Figura 19** estão apresentados os dados obtidos em um experimento que demonstra a capacidade da hemolinfa em proteger as células da morte após a infecção com baculovírus após 3 dias de infecção. A viabilidade celular foi determinada em Facs após marcação com Iodeto de propídio. Como pode ser observado na coluna do cultivo controle (sem infecção por baculovírus), as células apresentam uma alta viabilidade celular (94,56%) após marcação por PI e por DIOC6(3). Este último marcador identifica células com alto potencial de membrana e foi utilizado para que fosse possível visualizar as células vivas. Na coluna do meio correspondente as células infectadas, estão apresentados os resultados obtidos após 3 dias de infecção das células com 5 MOI de baculovírus. Como pode ser observado, após os 3 dias de infecção viral há um nítido aumento de morte celular por apoptose (22,65%) quando comparado com o cultivo controle não infectado (0,18%). Na última coluna o experimento foi realizado da mesma forma, porém com a adição de 1% (v/v) de hemolinfa, 1 hora antes da infecção viral. Como pode ser observado nessa coluna, há uma clara inibição da morte celular no cultivo infectado realizado na presença da hemolinfa (5,15%). Este efeito pode ser claramente observado nos gráficos em vermelho apresentados na primeira linha, os quais representam as populações marcadas pelo PI (mortas). Enquanto no cultivo infectado podem ser observadas duas populações distintas em FL-3 (em vermelho), sendo respectivamente uma população com baixa ou sem marcação com o PI (células vivas) (RN4) e uma população intensamente marcada pelo PI (células mortas) (RN5), no último gráfico, representativo do cultivo infectado e tratado com hemolinfa, apenas é visualizada uma população com baixa (RN4) ou sem marcação pelo PI (RN5), indicando claramente a proteção exercida pela hemolinfa. O número de células presentes na região Q1 e Q2 dos gráficos dos cultivos infectados e tratados com Hb também são bem inferiores ao observado no infectado e não tratado com hemolinfa.

Figura 19 - Citometria de fluxo de células Sf-9 infectadas ou não com baculovírus (5 MOI) e tratadas ou não com Hb.

Foram coletadas amostras de cada cultura no 3º dia após a infecção e foram coradas com 1 µg/mL de PI e 20 µM de DIOC6. Após 20 minutos de incubação as amostras foram aplicadas em um citometro de fluxo.

FONTE: Martins, L. M. 2011.

4.4 Efeito da hemolinfa sobre as mitocôndrias

4.4.1 Determinação do efeito da hemolinfa sobre o potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células Sf-9 após infecção por baculovírus

A **Figura 20** apresenta os resultados obtidos em cultivo, onde foi determinada a capacidade da hemolinfa sobre a proteção das células da morte por indução com baculovírus após 3 dias de infecção. A viabilidade celular foi determinada pelo potencial da membrana mitocondrial após marcação com DIOC6(3). Como pode ser observado, o número de células com alto potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) foi de 61,29% no cultivo infectado, enquanto que nas mesmas condições, 82,44% das células apresentaram alto potencial de membrana nos cultivos infectados e tratados com 1% (v/v) de hemolinfa. Isso sugere que proteínas presentes na hemolinfa são eficazes em inibir a morte celular induzida por baculovírus.

Figura 20 - Intensidade de fluorescência ($\Delta\Psi_m$) em cultivos de células Sf-9

Células Sf-9 foram tratadas ou não com 1% (v/v) de hemolinfa e infectadas com baculovírus selvagem (1 MOI). Amostras dos cultivos foram obtidas diariamente e analisadas em FACs para determinação do $\Delta\Psi_m$.

FONTE: Martins, L. M. 2011.

4.4.2 Efeito de diferentes concentrações de t-BHP sobre o potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células Sf-9

Para verificar o efeito protetor da hemolinfa sobre o $\Delta\Psi_m$, células Sf-9 foram tratadas com 1% (v/v) de hemolinfa bruta ou com a fração purificada. Após 1 hora, a morte celular foi induzida com o indutor químico terbutil (t-BHP) nas concentrações de 250, 500 e 750 μM , ficando em contato por 4 horas (**Figura 21**) ou nas concentrações de 125, 250 e 500 μM , ficando em contato *overnight* (**Figura 22**). Após este período os cultivos foram marcados com iodeto de propídio e DIOC6(3) e a fluorescência foi determinada em FACs. Tanto a hemolinfa bruta como a fração foi capaz de inibir a morte celular, mantendo o $\Delta\Psi_m$ maior que o observado no cultivo controle.

Figura 21 - Viabilidade de células Sf-9 após indução com t-BHP por 4 horas e com pré-tratamento ou não com hemolinfa total ou fração purificada (1% v/v).

Amostras dos cultivos foram obtidas e analisadas em FACs para determinação da intensidade de fluorescência após marcação com DIOC6(3) e iodeto de propídio.

FONTE: Martins, L. M. 2011.

Na **Figura 22**, é apresentado o efeito de diferentes concentrações de t-BHP sobre o potencial de membrana das mitocôndrias das células Sf-9 incubadas *overnight*. Como pode ser observado, existe um aumento progressivo na perda do potencial de membrana das mitocôndrias de acordo com o aumento das concentrações de t-BHP, sendo mais intenso que no experimento anterior, mesmo com uma quantidade menor do indutor.

Figura 22 - Viabilidade de células Sf-9 após indução com t-BHP *overnight*.

Amostras dos cultivos foram obtidas e analisadas em FACs para determinação da intensidade de fluorescência após marcação com DIOC6(3) e iodeto de propídio.

FONTE: Martins, L. M. 2011.

4.4.3 Efeito de diferentes concentrações de H_2O_2 sobre o potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células Sf-9

Para verificar o efeito do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sobre o $\Delta\Psi_m$, a morte celular foi induzida em células Sf-9 com 200, 400 e 600 μM de H_2O_2 por 4 horas. Após este período de contato, os cultivos foram marcados com 1 $\mu g/mL$ de iodeto de propídio (PI) e 20 μM de DIOC6(3). Após 20 minutos de contato, as amostras foram aplicadas a um citometro de fluxo e determinando o $\Delta\Psi_m$. Como pode ser observado na **Figura 23**, o H_2O_2 é capaz de reduzir o potencial de membrana das mitocôndrias. A perda do potencial de membrana acarreta na perda da viabilidade celular, com 600 μM esta perda significou cerca de 50%.

Figura 23 - Porcentagem de células Sf-9 com alto $\Delta\Psi_m$ após indução com H_2O_2 por 4 horas.

Após este período de contato os cultivos foram marcados com 1 $\mu g/mL$ de PI e 20 μM de DIOC6(3). Após 20 minutos de contacto as amostras foram aplicadas a um citometro de fluxo e determinado o $\Delta\Psi_m$.

FONTE: Martins, L. M. 2011.

Como pode ser observado na **Figura 24** a adição de 1% (v/v) de Hb ou da Frp foram capazes de inibir a morte induzida por H_2O_2 , mantendo alto o $\Delta\Psi_m$. O menor efeito protetor foi observado com a fração purificada no cultivo, onde a indução de morte foi realizada com 600 μM , podendo estar relacionado à quantidade efetiva de proteína antiapoptótica presente na fração.

Figura 24 - Efeito da hemolinfa na proteção da morte celular por H_2O_2 .

A

B

Células Sf-9 pré-tratadas ou não com 1% (v/v) de hemolinfa bruta ou purificada. Após este período a morte celular foi induzida com 400 μ M (**A**) ou 600 μ M (**B**) de H_2O_2 por 4 horas. Após este período de contato os cultivos foram marcados com 1 μ g/mL de PI e 20 μ M de DIOC6(3). Após 20 minutos de contato as amostras foram aplicadas a um citometro de fluxo e determinado o $\Delta\Psi_m$.

FONTE: Martins, L. M. 2011.

4.4.4 Determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células Sf-9 após a indução de morte celular com t-BHP e H_2O_2 e marcação com JC-1 e Hoechst 33324

Para estudar o efeito de proteção celular da hemolinfa, culturas de células Sf-9, após tratamento com hemolinfa ou com a fração purificada, foram induzidas à morte celular com 500 μM de t-BHP ou 600 μM de H_2O_2 por 4 horas. Após esse período, as células foram marcadas com JC-1 para a determinação do $\Delta\Psi_m$ e com Hoechst para verificar o número de células com o núcleo fragmentado. As células foram observadas em microscópio de fluorescência determinando-se o número de células com as diferentes características de marcação. As **Figuras 25 (A e B)** mostram que há uma boa proporcionalidade entre a positividade dos dois corantes. Praticamente todas as células foram coradas em verde no cultivo controle com 600 μM de H_2O_2 . Esta perda de potencial foi correspondente com as células marcadas com Hoechst onde praticamente todos os núcleos estavam fragmentados, comprovando a morte por apoptose. Por outro lado, nas células que receberam o tratamento com a hemolinfa bruta ou com a fração purificada, este efeito foi abolido.

Figura 25 - Efeito da hemolinfa na proteção de morte celular induzida por indutores químicos de apoptose.

A

B

As células Sf-9 foram pré-tratadas ou não com 1% (v/v) de hemolinfa bruta ou com a fração purificada por 1 hora. Após este período, a morte celular foi induzida com 500 µM de t-BHP ou 600 µM de H₂O₂ por 4 horas. Após o período de indução os cultivos foram marcados com 1 µg/mL de PI e 20 µM de JC-1 e Hoechst. Após 20 minutos de contato as amostras foram aplicadas a um citometro de fluxo e determinado o $\Delta\Psi_m$ e o número de células com núcleo fragmentado. **(A)** Porcentagem de células com alto $\Delta\Psi_m$, marcadas com JC-1; **(B)** Número de células com núcleo fragmentado, marcadas com Hoechst.

FONTE: Martins, L. M. 2011.

A **Figura 26** apresenta fotos de cultivos de células Sf-9 normais (1ª linha) e induzidas (2ª linha) obtidas após a marcação com JC-1 (1ª coluna) e Hoechst (2ª coluna). A última coluna respresenta a sobreposição das marcações com JC-1 e Hoechst. Estas fotos são representativas de todos os experimentos realizados, com ou sem o tratamento com a hemolinfa e com indução por t-BHP ou H₂O₂. Não foi observado nenhuma diferença em relação a marcação independentemente do indutor usado. Os cultivos tratados com hemolinfa bruta ou com a fração purificada foram idênticos aos controles normais, sem indução. No quadro abaixo estão apresentadas as fotomicrografia das diferentes populações observadas após os procedimentos relatados acima.

Figura 26 - Fotomicrografias de células Sf-9 após a indução da morte celular.

Células Sf-9 foram induzidas a apoptose por 4 horas com indutores químicos e marcação com JC-1 e Hoechst 33324 por 20 minutos. As amostras foram observadas em microscópio de fluorescência com um aumento de 40x.

FONTE: Martins, L. M. 2011.

4.5 Eletroforese bidimensional de células Vero

Para uma análise comparativa do perfil de proteínas expressas pelas células em diferentes condições de cultivo, foram feitos géis de eletroforese bidimensional (2-D). Essa técnica nos permite verificar as variações dos perfis protéicos que estão sendo expressos pelas células sob determinadas condições, onde podem ser comparadas diferentes condições de cultivo, podendo visualizar um possível aumento, diminuição, surgimento ou desaparecimento de determinadas proteínas.

Para a realização desta análise comparativa em eletroforese bidimensional, células Vero normais e células Vero com a adição de 1% (v/v) de hemolinfa por 1 hora, foram coletadas e, então, foi adicionado o tampão de extração de proteínas, que é empregado para lisar as células e extrair as proteínas intracelulares.

Para que seja possível a visualização da maior parte das proteínas expressas, principalmente as com baixa expressão, é necessário obter uma amostra

bem concentrada, a qual ainda não foi possível obter da maneira desejada, estamos trabalhando para que ocorra a resolução desse problema. Com isso, os géis apresentados nas **Figuras 27 e 28**, são apenas a apresentação de dados preliminares. A **Figura 27** mostra os géis de eletroforese bidimensional dos cultivos de células Vero e dos cultivos de células Vero com a adição da hemolinfa, corados por coomassie blue–R350. Os mesmos géis foram corados novamente por impregnação por nitrato de prata, isso se fez necessário devido ao fato da coloração com prata ser mais sensível que o coomassie blue, permitindo a revelação de outros spots que não foram possíveis visualizar nos géis corados com o coomassie blue, **Figura 28**.

Figura 27 - Géis de eletroforese bidimensional de células Vero corados com coomassie blue.

(A) Células Vero; **(B)** Células Vero com a adição de 1% (v/v) de hemolinfa bruta. Os géis foram revelados por corante coomassie blue.
FONTE: Martins, L. M. 2011.

Figura 28 - Géis de eletroforese bidimensional de células Vero corados com nitrato de prata.

(A) células Vero; **(B)** células Vero com a adição de 1% (v/v) de hemolinfa bruta. Os mesmos géis corados com coomassie blue foram revelados novamente pelo método de impregnação por nitrato de prata. As legendas acima de cada gel representa a faixa de pH das strips utilizadas para determinar o ponto isoelétrico (PI).

FONTE: Martins, L. M. 2011.

Como pode ser observado na **Figura 29**, há uma intensa alteração na expressão de proteínas, seja em intensidade como em presença. A comparação entre os dois perfis mostra que existe um padrão diferente de proteínas expressas pelas células Vero ao ser adicionada a hemolinfa aos cultivos. Algumas proteínas aumentam sua expressão, enquanto outras diminuem. Por outro lado, algumas proteínas aparecem ou desaparecem dos géis conforme o experimento. Estas proteínas podem ter profunda influencia nos efeitos observados.

Figura 29 - Análise prévia da expressão de proteínas.

Géis de eletroforese bidimensional mostrando as proteínas que aparecem e desaparecem, assim como aumentam ou diminuem a sua expressão. **(A)** Perfil protéico dos cultivos de células Vero normais; **(B)** Perfil protéico dos cultivos de células Vero com adição da hemolinfa bruta de *Lonomia obliqua*.

FONTE: Martins, L. M. 2011.

4.6 Espectrometria de massa e obtenção da sequência de aminoácidos da região C-terminal da proteína antiapoptótica

Uma análise em espectrometria de massa em um MALDI-Q-TOF Premier (Waters), no Laboratório Nacional de Luz Sincontron (LNLS) foi realizada com a proteína purificada da hemolinfa de *Lonomia obliqua*, que foi extraída do gel de eletroforese em poliacrilamida SDS-PAGE após a digestão da mesma por tripsina. A sequência obtida foi analisada e comparada as sequências depositadas no banco de dados biológicos *GenBank*, onde encontramos uma sequência descrita como **hypothetical protein 22 [Lonomia obliqua] (AAV91437.1)**. Através desta análise foi verificado que a proteína antiapoptótica, parcialmente sequenciada por nós, possui apenas a porção C-terminal depositada (**Figura 30**).

Figura 30 - Sequência C-terminal da proteína antiapoptótica.

```
GHYGRGTFLEMDWFTHKINPGQNKIVRNSNEFLIFKEDSQPMTELLKML  
DEGVIPHDMSEDYSYLPKRLMLPRGTEGGFPFQFFVFVYPFESSTKNLTP  
FEAFMIDNKPLGYPFDRPVVESLEFKQPNMYFKDVLVYHEGEYNPYKLNVP  
SYFTHSNKVPKH
```

A sequência C-terminal foi obtida através de uma análise em espectrometria de massa.

FONTE: Martins, L. M. 2011.

5 DISCUSSÃO

A citotoxicidade foi definida por Nardone (1977) como sendo o conjunto de alterações da homeostase celular que leva a uma série de modificações que interferem na capacidade adaptativa das células, bem como sua sobrevivência, multiplicação e realização de suas funções metabólicas. A intensidade da lesão celular depende de vários fatores, tais como, a concentração do material testado, o tempo de exposição, o tipo de célula, a capacidade do composto em penetrar na célula, entre outras (HU; HSIUNG, 1989).

Concentrações de 0.5, 1, 2, 5 e 10 % de hemolinfa de *Lonomia obliqua* foram testadas para verificar a citotoxicidade sobre células Vero e, como foi demonstrado na **Figura 10**, a hemolinfa não se mostrou citotóxica às células nas concentrações de 0.5, 1 e 2 %. A partir deste resultado, foi determinada a utilização de 1% (v/v) em todos os ensaios realizados posteriormente.

Foi relatado que a hemolinfa do bicho da seda inibe a apoptose nos momentos avançados dos cultivos, tanto em células de inseto quanto em células humanas (CHOI; RHEE; PARK, 2002). Recentemente a equipe do laboratório reportou a ocorrência de morte celular por apoptose em cultivos de células de mamíferos e de insetos com depleção de nutrientes (MENEZES-ACOSTA, 2001; MENDONÇA et al., 2002) ou por indução de agentes químicos (SOUZA et al., 2005), e que a suplementação de culturas de células de inseto e de mamífero com a hemolinfa de *Lonomia obliqua* pode estender a viabilidade da cultura evitando a morte por apoptose (MARANGA et al., 2003, RAFFOUL et al., 2005, SOUZA et al., 2005). A adição desta proteína ao cultivo em processo de morte por apoptose permitiu o prolongamento da vida celular, o que pode levar a uma maior replicação viral e conseqüentemente uma maior produção de proteínas recombinantes expressas por baculovírus. 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). Pelos dados obtidos, aparentemente, a presença desta proteína da hemolinfa da *Lonomia obliqua* poderia estar potencializando o efeito antiapoptótico. Resultados semelhantes a esse relatado foi evidenciado nos experimentos mostrados nas **Figuras 11, 12 e 13**.

A ação da hemolinfa sobre as células fica claramente demonstrada nos primeiros experimentos, seja no crescimento ou na manutenção da viabilidade

celular, onde a sua capacidade de atuação foi verificada tanto em células de inseto da linhagem Sf-9 (**Figura 13**), como em células de mamífero da linhagem Vero (**Figuras 11 e 12**). Esta ação, pelo menos em parte, está relacionada à característica antiapoptótica de uma de suas proteínas, a qual fica evidente na **Figura 13**, que demonstra a capacidade da hemolinfa em proteger as células contra a apoptose após a infecção das mesmas com baculovírus. A adição da hemolinfa aos cultivos não apenas bloqueia a morte induzida pelo vírus, mas também a morte fisiológica que ocorre normalmente por stress de cultivo. Como observado na **Figura 11**, as células Vero que receberam o tratamento com a hemolinfa permaneceram vivas por mais tempo, indicando que esta proteína também poderia ser utilizada como suplemento de meios de cultura. Com o bloqueio da morte celular, a célula continua funcional, e essa funcionalidade é um indício fundamental quando se pensa em utilizar uma proteína com estas características como fármaco.

Após à constatação da presença de uma proteína com ação antiapoptótica na hemolinfa da *Lonomia obliqua*, foram realizados dois passos de cromatografia líquida, com a finalidade de separar a proteína de interesse das demais contidas na hemolinfa bruta (**Figuras 14 e 15**). A proteína antiapoptótica se demonstrou estável e com ação predominante sobre as outras proteínas da hemolinfa, por isso, não houve a necessidade de uma separação com alto grau de pureza. A **Figura 16** mostra o resultado desta separação, com o perfil eletroforético das proteínas em cada um dos passos de cromatografia utilizados neste trabalho.

As mitocôndrias estão envolvidas em muitos processos essenciais para a sobrevivência celular, incluindo produção de energia, controle redox, homeostasis de cálcio e certas vias metabólicas e de biosíntese. Além disso, as mitocôndrias têm um papel essencial no processo de morte celular conhecido como apoptose. Esta via mitocondrial de morte por apoptose pode sofrer disfunções ocasionando várias doenças como câncer, diabetes, isquemia e desordens neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (BOUCHIER-HAYES; LARTIGUE; NEWMAYER, 2005).

Devido aos inúmeros mecanismos de ativação da morte por apoptose, a determinação do mecanismo de ação das diferentes proteínas antiapoptóticas, em especial daquelas de amplo espectro de ação, seja inibindo a morte por diferentes indutores ou prevenindo esta morte em diferentes tipos celulares, podem ser de alto interesse médico e biotecnológico.

Foi verificado pela equipe do laboratório que a ação provável da proteína antiapoptótica seria sobre a membrana das mitocôndrias, mantendo o potencial elétrico alto, e evitando a permeabilidade da membrana. Ao contrário do que ocorre com as proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2, a proteína antiapoptótica da *Lonomia obliqua* possui a capacidade de inibir a apoptose em diferentes tipos de células, seja de mamíferos, seja de inseto, por diferentes indutores. Os dados obtidos neste trabalho sugerem que o local de ação desta proteína poderia ser similar aquele das proteínas da família Bcl-(x) visto que, em todos os experimentos, foi observado um bloqueio da morte por apoptose, com evidente proteção do potencial da membrana mitocondrial.

A proteína responsável por este efeito antiapoptótico foi identificada como sendo uma proteína com peso molecular de aproximadamente 51 kDa. O efeito protetor da proteína fica evidente na **Figura 17**, onde a morte foi induzida com um potente agente indutor de morte celular, o terbutyl. Nestas condições a proteína antiapoptótica foi capaz de inibir a morte induzida em células de inseto (Sf-9) com concentrações superiores a 750 μ M de t-BHP. O mesmo efeito foi observado com o peróxido de hidrogênio (**Figura 24**).

A citometria de fluxo demonstrou ser uma excelente metodologia para caracterizar as diferentes populações celulares. Esta técnica foi utilizada em todos os experimentos realizados para a determinação do $\Delta\Psi_m$ e da mortalidade celular (apoptose), sendo que todos os valores apresentados nas figuras foram obtidos das análises de gráficos de citometria de fluxo. A definição das áreas foi determinada por informações obtidas em literatura. Assim sendo, é definido que o quadrante Q1 é constituído por células apoptóticas. Estas células apresentam pequeno tamanho (baixo FSC) e alta granulosidade (alto SSC), sendo intensamente coradas por PI. Da mesma forma, são células que não apresentam $\Delta\Psi_m$. O quadrante Q2 é formado por células necróticas, as quais são coradas por PI. O que as diferenciam das apoptóticas é o fato de apresentarem o tamanho de células normais e um alto $\Delta\Psi_m$. Por outro lado, as células presentes no Quadrante Q3 são consideradas células normais e com alta viabilidade. Por característica elas possuem um alto $\Delta\Psi_m$, não são marcadas com PI e apresentam tamanho de células normais. O material presente com baixo tamanho e granulosidade e que não são corados com nenhum dos marcadores pode ser debris celular ou corpos apoptóticos. A característica de

cada uma destas populações tem sido confirmada por outras técnicas como microscopia eletrônica, corantes específicos para cada um dos tipos celulares, etc (PETIT et al., 1995, VIEIRA et al., 2002).

A utilização do DIOC6(3) mostrou-se bastante efetivo na determinação do $\Delta\Psi_m$, tendo sido intensamente utilizado por outros autores com este objetivo. Porém, para termos certeza da conclusão de que a hemolinfa estaria atuando sobre as mitocôndrias, utilizamos outro corante para esta determinação. Este segundo corante foi o JC-1, o qual também tem sido largamente utilizado por outros pesquisadores com esta finalidade (SMILEY et al., 1991). Os resultados obtidos com este marcador foram similares aqueles obtidos com o DIOC6(3). No entanto, a diferença do $\Delta\Psi_m$ observado em células com indução com água oxigenada foi mais intensa (**Figura 25**) do que o observado com o DIOC6(3) (**Figura 24**). A diferença do $\Delta\Psi_m$ também foi significativamente maior quando comparamos a ação do terbutil com a ação da água oxigenada. Enquanto o efeito indutor do terbutyl foi de cerca de 20%, o peróxido de hidrogênio induziu a morte em 100% das células. Esta morte foi basicamente por apoptose. Como observado na **Figura 25 (B)**, praticamente 100% das células induzidas por peróxido de hidrogênio apresentaram núcleo fragmentado (quando corados por Hoescht). Mesmo neste caso a hemolinfa e em especial a fração foram muito eficazes em inibir a morte celular. Estes valores foram determinados por contagem das células em microscópio de fluorescência.

Para finalizar, foi demonstrado na **Figura 29**, que a adição de 1% (v/v) de hemolinfa aos cultivos de células Vero, foi capaz de provocar uma mudança no perfil das proteínas expressas pelas células em condições normais. Essa mudança foi observada tanto no aumento quanto na diminuição, assim como, no aparecimento ou desaparecimento total da expressão de determinadas proteínas. A alteração da expressão dessas proteínas provavelmente é responsável pelos efeitos observados nos outros experimentos demonstrados neste trabalho. O próximo passo será definir quais são essas proteínas, e determinar qual a função de cada uma delas nas células, e assim tentar identificar a sua importância no processo de apoptose.

Pelo amplo espectro de ação desta proteína, que age tanto em células de inseto, como de mamíferos, seja por indução de apoptose por agentes químicos, virais ou nutricionais, acreditamos que talvez esta proteína possa atuar como um supressor geral do processo de apoptose, por uma via conservada em diversos

organismos. Se assim for, eventualmente esta proteína poderá atuar em sinergismo com a p35 presente no baculovírus ou outros inibidores citológicos de apoptose, permitindo uma maior replicação viral e expressão de proteínas recombinantes, principalmente daqueles recombinantes que estejam sob controle da poliedrina, promotor este de ação tardia, momento no qual a ação do p35 já não é capaz de evitar a morte celular (HERSHBERGER; LACOUNT; FRIESEN, 1994).

6 CONCLUSÕES

- 1) Existe pelo menos uma proteína presente na hemolinfa de *Lonomia obliqua* capaz de aumentar o crescimento e a viabilidade celular.
- 2) A hemolinfa não se mostrou citotóxica aos cultivos celulares nas concentrações 0.5, 1 e 2%.
- 3) A proteína Frp, isolada da hemolinfa, foi capaz de afetar o processo de apoptose, inibindo a morte das células.
- 4) Provavelmente o local de ação da proteína seja sobre a mitocôndria, mais especificamente sobre a manutenção do potencial elétrico de membrana mitocondrial, visto que ela foi muito eficaz em manter um alto $\Delta\Psi_m$ nos cultivos, nos quais a morte celular foi induzida por agentes indutores de stress oxidativo (terbutyl e peróxido de hidrogênio).

REFERÊNCIAS*

- ALMEIDA, M. S.; KURTENBACH, E. Como purificar proteínas? **Biotec. Ciênc. Desenvol.** v. 24, p. 30-35, 2002.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesq.** v. 1, p. 37-58, 2007.
- AROCHA-PINANGO, C. L.; GUERRERO, B. *Lonomia* genus caterpillar envenomation: clinical and biological aspects. **Haemostasis.** v. 31, p. 288-293, 2001.
- ASHKENAZI A. Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. **Nat. Rev. Cancer.** v. 2, p. 420-430, 2002.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 10, p. 411-421, 1999.
- BOUCHIER-HAYES, L.; LARTIGUE, L.; NEWMEYER, D. D. Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. **J. Clin. Invest.** v. 115, n. 10, p. 2640-2647, 2005.
- BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 68, p. 283-291, 2005.
- CARTER, J. B.; SAUNDERS, V. A. **Virology: Principles and Applications.** Londres: John Wiley & Sons, 2007.
- 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. **J. Virol.** v. 68, p. 7728-7737, 1994.
- CESTARI, A. N.; SIMÕES, L. C. G. Cultura de Tecidos de Insetos. **Anais do Simpósio Sobre Cultura de Células**, São Paulo: Publicação ACIESP, 1978. (9)10: 143-191 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. **Biochem. Eng. J.** v. 24, p. 225-233, 2005.
- 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. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 99, p. 12628-12632, 2002.

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

CHOI, S. S.; RHEE, W. J.; PARK, T. H. Inhibition of human cell apoptosis by silkworm hemolymph. **Biotechnol. Prog.** v. 18, p. 874-878, 2002.

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

DUARTE, A. C.; CAO VILLA, 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. **J. Bras. Nefrol.** v. 12, p. 184-187, 1990.

DREWS, J. Drug Discovery: A Historical Perspective. **Science**. v. 287, p. 1960-1964, 2000.

FERNANDEZ, R. S.; COTTER, T. G. Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death. **Biochem. Pharmacol.** v. 48, p. 675-681, 1994.

FERRI, K. F.; JACOTOT, E.; BLANCO, J.; ESTÉ, J. A.; ZAMZAMI, A.; SUSIN, S. A.; BROTHERS, G.; XIE, Z.; REED, J. C.; PENNINGER, J. M.; KROEMER, G. Apoptosis Control in Syncytia Induced by the HIV Type 1-Envelope Glycoprotein Complex: Role of Mitochondria and Caspases. **J. Exp. Med.** v. 192, n. 8, p. 1081-1092, 2001.

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. 241-244 p.

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

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**. v. 25, p. 4798-811, 2006.

NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **GenBank**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 14 fev. 2010.

GRACE, T. D. C. Effects of various substances on growth of silkworm tissue in vitro. **Austr. J. Biol. Sci.** 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, p. 613, 1967.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications insight? **J. Clin. Invest.** v. 115, p. 2610–2617, 2005.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309–1312, 1998.

GREENFIELD, C.; PATEL, G.; CLARK, S.; JONES, N.; WATERFIELD, M. D. Expression of the human EGF receptor with ligand-stimulatable kinase activity in insect cells using a baculovirus vector. **EMBO J.** v. 7, p. 139-146, 1988.

GRUSS, H. J.; DUYSER, J.; HERRMANN, F. Structural and biological features of the TNF receptor and TNF ligand superfamilies: Interactive signals in the pathobiology of Hodgkin's disease. **Ann. Oncol.** v. 7, p. 150, 1996.

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 Lett.** v. 422, p. 74-78, 1998.

HEALTHCARE, G. E. **2-D Electrophoresis: Principles and Methods**. 2004, 162 p.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**. v. 407, p. 770-776, 2000.

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. **J. Virol.** v. 68, p. 3467-3477, 1994.

HIRSCH, J.; HANSEN, K. C. Proteomics: Current techniques and Potential Applications to Lung Disease. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.** v. 287, p.23, 2004.

HU, J. M.; HSIUNG, G. D. Evaluation of new antiviral agents: In vitro perspectives. **Antiviral Res.** v. 11, p. 217-232, 1989.

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) schmitti*. **Peptides**. v. 21, p. 331-338, 2000.

IKEDA, K.; KAJIWARA, K.; TANABE, E.; TOKUMARU, S.; KISHIDA, E.; MASUZAWA, Y.; KOJO, S. Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in chemically induced apoptosis of HL60 cells. **Biochem. Pharm.** v. 57, p. 1361-1365, 1999.

IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y. J.; AGATHOS, S. N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 62, p. 1-20, 2003.

JONES, G.; MANCZAK, M.; HORN, M. Hormonal regulation and properties of a new group of basic hemolymph proteins expressed during insect metamorphosis. **J. Biol. Chem.** 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. **J. Gen. Virol.** v. 81, p. 1135-1141, 2000.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer.** v. 26, p. 239-57, 1972.

KIM, E. J.; RHEE, W. J.; PARK, T. H. Isolation and Characterization of an Apoptosis-Inhibiting Component from the Hemolymph of Bombyx Mori. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 285, p. 224-228, 2000.

KRAMMER, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature.** v. 407, p.789-95, 2000.

KROEMER, G.; REED, J. C. Mitochondrial control of cell death. **Nat. Med.** v. 6, p. 513-519, 2000.

KRETZMER, G. Industrial processes with animal cells Applied Microbiology and Biotechnology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 59, 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*. **Physiol. B Biochem. Mol. Biol.** v. 109, p. 105-114, 1994.

LAEMMLI, U. R. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature.** v. 227, p. 680-685, 1970.

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.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Oncogenes, Tumor Suppressor Genes, and Programmed Cell Death. In: LEHNINGER, A. L, **Principles of Biochemistry**, 4. ed. New York: Worth Publishers, 2007.

LEMAIRE, C. **Révision du genre Lonomia Walker (Lep. Attacidae).** Ann. Soc. Entomol. France, v. 8, p. 767-861, 1972.

LI, P. Cytochrome c and ATP-dependent formation of Apaf-1/capase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell.** v. 91, p. 479-489, 1997.

LIN, C. Y.; CHEN, S. H.; KOU, G. H.; KUO, C. M. Identification and characterization of a hyperglycemic hormone from freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.** v. 121, p. 315-321, 1998.

LIU, Q. A.; HENGARTNER, M. O. The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 887, p. 92-104; 1999.

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

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*. **J. Biol. Chem.** v. 274, p. 20092-20097, 1999.

LUCKOW, V. A. Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors. In: PROKOP, A.; BAJPAI, R. K.; HO, C. **Recombinant DNA technology and applications**. New York: McGraw-Hill, 1991, 24 p.

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. **Biotechnol. Progr.** v. 19, p. 58-63, 2003.

MARIANI, S. M.; KRAMMER, P. H. Detection of active infection of Sf9 insect cells by recombinant baculoviruses. **J. Virol. Methods.** v. 69, p. 19-28, 1997.

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

MARZO, I.; BRENNER, C.; ZAMZAMI, N.; JÜRGENSMEIER, J.; SUSIN, S. A.; VIEIRA, H. L. A.; PRÉVOST, M-C.; XIE, Z.; MUTSIYAMA, S.; REED, J.C.; KROEMER, G. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. **Science**, v. 281, p. 2027-2031, 1998.

MATSURA, T.; KAI, M.; FUJII, Y.; ITO, H.; YAMADA, K. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL60 cells requires caspase-3 activation. **Free Rad. Res.** v. 30, p. 73-83, 1999.

MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicol. Letters**, v. 99, p. 157-168, 1998.

MENDONÇA, R. Z.; ARRÓZIO, S. J.; ANTONIACCI, M. M.; FERREIRA JR, J. M. C.; PEREIRA, C.A. Metabolic-active-high density VERO cell cultures on microcarriers following apoptosis prevention by galactose/glutamine feeding. **J. Biotechnol.** 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.

MENEZES-ACOSTA, A.; MENDONÇA, R. Z.; MERCHANT; H.; COVARRUBIAS, L.; RAMIREZ, O. T. Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells

and hybridoma cultures. **Biotechnology Bioengineering**. v. 72, n. 4, p. 4441-4572, 2001.

MITSUHASHI, J. **Invertebrates cell system applications**. Flórida: CRC Press, 1989. 702-543 p.

MOON, H.J.; KURATA, S.; NATORI, S.; LEE, B.L. Purification and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Holotrichia diomphalia* larvae. **Biol. Pharm. Bull.** v. 18, p. 1049-1052, 1995.

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia de Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**. Flórida: Taylor & Francis Group, 2008.

MORAES, R.H.P. **Lagartas urticantes**. São Paulo: Biológico, 1997. vol. 59. n.2. 21-25 p.

NARDONE, R. M. Toxicity testing in vitro. In: ROTBBLAT, G. H.; CRISTOFALO, V. J. **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York: Academic, 1977. 471-495 p.

NUSSBAUMER, C.; HINTON, A.C.; SCHOPF, A.; STRADNER, A.; HAMMOCK, B.D.; Isolation and characterization of juvenile hormone esterase from hemolymph of *Lymantria dispar* by affinity- and by anion-exchange chromatography. **Insect Biochem. Mol. Biol.** v. 30, p. 307-14, 2000.

OBERHAMMER, F.; WILSON, J. W.; DIVE, C.; MORRIS, I. D.; HICKMAN, J. A.; WAKELING, A. E.; WALKER, P. R.; SIKORSKA, M. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. **EMBO J.** v. 12, p. 3679-3684, 1993.

OCHANDA, J. O.; OSIR, E. O.; NGUU, E. K.; OLEMBO, N. K. Isolation and properties of 600-kDa and 23-kDa haemolymph proteins from the tsetse fly, *Glossina morsitans*: their possible role as biological insecticides. **Scand. J. Immunol. Suppl.** v. 11, p. 41-47, 1992.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory annual**. New York: Oxford University Press, 1992.

OURTH, D.D. Antiviral activity against human immunodeficiency virus-1 in vitro by myristoylated-peptide from *Heliothis virescens*. **Bioch. Biophys. Res. Commun.** v. 320, p. 190-196, 2004.

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. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1171, p. 247-254, 1993.

PETIT, P. X.; LECOEUR, H.; ZORN, E.; DAUGUET, C.; MIGNOTTE, B.; GOUGEON, M. L. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. **J. Cell Biol.** v. 130, p. 157-167, 1995.

RAFFOUL, T.; SWIECH, K.; ARANTES, M. K.; SOUZA, A. P. B.; MENDONÇA, R. Z.; PEREIRA, C. A.; SUAZO, C. A. T. Performance evaluation of CHO-K1 cell in culture medium supplemented with hemolymph. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 48, p. 85-95, 2005.

RANGANATH, R. M.; NAGASHREE, N. R. Role of programmed cell death in development. **Int. Rev. Cytol.** v. 202, p. 159-242, 2001.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. **Am. J. Hyg.** v. 27, p. 493-497, 1938.

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. **Biotechnol. Prog.** v. 15, p. 1028-1032, 1999.

RHEE, W. J.; PARK, T. H. Silkworm Hemolymph Inhibits Baculovirus-Induced Insect Cell Apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 271, p. 186-190, 2000.

RHIEL, M.; MURHAMMER, D. W. The effect of oscillating dissolved oxygen concentrations on the metabolism of a *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf21-AE clonal isolate. **Biotechnol. Bioeng.** v. 4, p. 640-650, 1995.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc. Res.** 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 Differ.** v. 10, p. 451-60, 2003.

SHIMIZU, S.; NARITA, M.; TSUJIMOTO, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. **Nature.** v. 3, p. 483-487, 1999.

SHIMIZU, S.; MATSUOKA, Y.; SHINOHARA, Y.; YONEDA, Y.; TSUJIMOTO, Y. Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. **J. Cell Biol.** v. 22, p. 237-50, 2001.

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

SHISHIKURA, F.; ABE, T.; OHTAKE, S.; TANAKA, K. Purification and characterization of a 58,000-Da proteinase inhibitor from the hemolymph of a solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.** v. 114, p. 1-9, 1996.

SHISHIKURA, F.; ABE, T.; OHTAKE, S.; TANAKA, K. Purification and characterization of a 39,000-Da serine proteinase from the hemolymph of a solitary

ascidian, *Halocynthia roretzi*. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.** v. 118, p. 131-41, 1997.

SILVA JR, J.G. **Cromatografia de proteínas: guia teórico e prático**. Rio de Janeiro: Interciência; 2004.

SLATER, A. F. G.; STEFAN, C.; NOBEL, I.; VAN DEN DOBBELSTEEN, D.J.; ORRENIUS, S. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. **Toxicol. Letters**. v. 82/83, p. 149-153, 1995.

SLEE, E. A.; ADRAIN, C.; MARTIN, S. J. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. **Cell Death Differ.** v. 6, p. 1067-1074, 1999.

SMILEY, S. T.; REERS, M.; MOTTOLA-HARTSHORN, C.; LIN, M.; CHEN, A.; SMITH, T. W.; STEELE, G. D.; CHEN, L. B. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate forming lipophilic cation JC-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 88, p. 3671-3675, 1991.

SMITH, G. E.; JR, G.; ERICSON, B. L.; MOSCHERA, J.; LAHM, H. W.; CHIZZONITE, R.; SUMMERS, M. D. Modification and secretion of interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 82, p. 8404-8408, 1985.

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. **Biotechnol. Progr.** v. 21, p. 99-105, 2005.

STEINER, H.; POH, G.; HELLERS, M.; ELHAMMER, A.; HANSSON, L.; Human tissue- type plasminogen activator synthesized by using a baculovirus vectors in insect cells compared with human plasminogen activator produced in mouse cells. **Gene**. v. 73, p. 449-457, 1988.

STRASSER, A.; JOST, P. J.; NAGATA, S. The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System. **J. Immunity**. v. 30, p. 180-192, 2009.

VERMUNT, A. M.; VERMEESCH, A. M.; KORT, C. A. Purification and characterization of juvenile hormone esterase from hemolymph of the Colorado potato beetle. **Arch Insect Biochem. Physiol.** v. 35, n. 3, p. 261-277, 1997.

VIEIRA, H. L.; HAOUZI, D.; EL HAMEL, C.; JACOTOT, E.; BELZACQ, A. S.; BRENNER, C.; KROEMER, G. Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. **Cell Death Differ.** v. 7, p. 1146-1154, 2000.

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

WANG, W.; ROBERTS, C. J. **Aggregation of therapeutic proteins**. Hoboken, N.J. : Wiley, 2010. 4 p.

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

WICKHAM, T. J.; DAVIS, T.; GRANADOS, R. R.; SHULER, M. L.; WOOD, H. A. Screening of Insect Cell Lines for the Production of Recombinant Proteins and Infectious Virus in the Baculovirus Expression System. **Biotechnol. Prog.** v. 8, p. 391-396, 1992.

WOJCHOWSKI, D. M.; ORKIN, S. T. H.; SYTKOWSKI, A. J. Active erythropoietin expressed in insect cells using a baculovirus vector: a role for N-linked oligosaccharide. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 910, p. 224-232, 1987.

WOO, S. D.; KIM, W. J.; KIM, H. S.; 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. **Mol. Cell.** v. 7, p. 572-574, 1997.

WYATT, S.S. Culture in vitro of tissue from the silkworm *Bombix mori*. **J. Gen. Physiol.** v. 39, p. 841-852, 1956.

YAMAMOTO, Y.; WATABE, S.; KAGEYAMA, T.; TAKAHASHI, S. Y. Purification and characterization of Bombyx cysteine proteinase specific inhibitors from the hemolymph of *Bombyx mori*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** v. 42, p. 119-129, 1999.

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

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol. Sci.** v. 19, p.124-28, 2004.

APÊNDICE - Titulação viral através do método da diluição final.

1. Fazer diluições seriadas do vírus a ser titulado (10^{-1} a 10^{-10}) utilizando 10 frascos eppendorfs de 1,5 mL de capacidade, empregando 0,9 mL do meio de cultura L-15 e 0,1 mL de suspensão viral a partir da maior diluição;
2. Marcar numa placa de 96 poços uma diluição por coluna;
3. Semear as células Vero a serem utilizadas na concentração de $3,5 \times 10^5$ células viáveis/mL em todos os poços da placa. Colocar 100 μ L de volume de cultura por poço;
4. Após a adesão das células à placa, começando com a menor diluição viral (10^{-10}), adicionar 100 μ L de amostra viral nos poços da coluna marcada para aquela diluição. Os poços que restam na coluna serão utilizados como ensaios controle (sem infecção);
5. Repetir o procedimento para as outras diluições virais, conforme ilustrado na **Figura A.1**;
6. Incubar a microplaca, em estufa a 37 °C. Verificar as células infectadas através da presença de efeito citopático característico do vírus estudado;
7. Calcular a titulação viral segundo *Reed e Muench* (1938), descrito no exemplo a seguir, apresentado na **Figura A.2**.

Figura A.1. Representação esquemática do procedimento de cultivo das amostras virais através de diluições seriadas.

FONTE: Carter; Saunders, 2007.

A **Figura A.1** ilustra um exemplo de resultados obtidos de uma titulação realizada em microplaca com 96 poços. As diluições virais foram realizadas em oito replicatas. As demais cavidades foram empregadas como controle, ou seja, sem infecção. Para a determinação da percentagem de células infectadas as seguintes variáveis foram definidas: DP (distância proporcional), A (% com resposta acima de 50% de infecção) e B (% com resposta abaixo de 50% de infecção). Contabilizam-se os poços nos quais pelo menos 50% das células foram infectadas. A **Figura A.2** apresenta o exemplo dos resultados obtidos da leitura da placa e a metodologia do cálculo a partir do resultado da leitura da placa.

Figura A.2. Metodologia do cálculo da titulação viral segundo *Reed e Muench* (1938), através dos dados obtidos da leitura dos poços das placas de cultivo.

Virus dilution	Infections per number inoculated	Observed values		Cumulative values ¹		Infection ratio ²	% infection ³
		Positive	Negative	Positive	Negative		
10 ⁻¹	8/8	8	0	24	0	24/24	100
10 ⁻²	7/8	7	1	16	1	16/17	94
10 ⁻³	5/8	5	3	9	4	9/13	69
10 ⁻⁴	3/8	3	5	4	9	4/13	31
10 ⁻⁵	1/8	1	7	1	16	1/17	6
10 ⁻⁶	0/8	0	8	0	24	0/24	0

¹The cumulative values are derived by adding up the observed values in the direction of the arrows.
²The infection ratio is the number of positives for the cumulative value out of the total for the cumulative value.
³The % infection is the infection ratio converted to a percentage.

It had already been determined that the dilution of virus that contains one TCID₅₀ lies between 10⁻³ and 10⁻⁴, so the end point can be expressed as 10^{-(3+x)}, where x is the value to be estimated.

$$x = \log_{10} \text{dilution factor} \left(\frac{\% \text{ infection at next dilution above } 50\% - 50}{\% \text{ infection at next dilution above } 50\% - \% \text{ infection at next dilution below } 50\%} \right)$$

$$= 1 \left(\frac{69 - 50}{69 - 31} \right)$$

$$= 0.5$$

End point = 10^{-(3+0.5)} = 10^{-3.5}.
 i.e. 1 ml of a 10^{-3.5} dilution contains one TCID₅₀ of virus
 i.e. 1 ml of a 1/3200 dilution contains one TCID₅₀ of virus.
 (3.2 is the antilogarithm of 0.5)
 The concentration of virus in the undiluted suspension is 3.2 × 10³ TCID₅₀/ml.

FONTE: Carter; Saunders, 2007.

A determinação do título viral foi realizada empregando-se a metodologia da diluição final, descrita por Reed e Muench (1938), segundo o procedimento a seguir:

Foram preparadas diluições seriadas do vírus (10⁻¹ a 10⁻¹²) e 100µl de amostra referente a cada diluição viral foram adicionadas a seis cavidades de uma placa de células Sf-9 contendo 100µl por cavidade com a concentração celular de 3,5x10⁶ células/ml. Após a infecção das células com as 12 diluições virais, a placa foi incubada a 28°C por 14 dias. Observando-se as células através de microscópio óptico, o número de cavidades contendo células infectadas apresentando poliedros foi determinado.

ANEXO – Artigos

Artigo submetido à revista Antiviral Research, em fase de impressão:

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.

Artigo submetido à revista Applied Microbiology and Biotechnology, em fase de avaliação:

Mendonça, R. M. Z.; Martins, L. M.; Pereira, A. C. P.; Peixoto, C. C.; Giovanni, D. N. S.; Carmo, A. C. V.; Moraes, R. H. P.; Alves, P.M.

Study of an anti apoptotic protein isolated and the mitochondria participation.