DALTON GIOVANNI NOGUEIRA DA SILVA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE PROTEÍNA ANTIVIRAL PRESENTE
NA HEMOLINFA DE *LONOMIA OBLIQUA* POR TECNOLOGIA DE
DNA RECOMBINANTE EM *ESCHERICHIA COLI***

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/
Instituto Butantan / IPT para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2014

DALTON GIOVANNI NOGUEIRA DA SILVA

**Clonagem e expressão de proteína antiviral presente na hemolinfa
de *Lonomia obliqua* por tecnologia de DNA recombinante em
*Escherichia coli***

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação Interunidades em Biotecnologia USP /
Instituto Butantan / IPT para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça

Versão original

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Dalton Giovanni Nogueira da.

Clonagem e expressão de proteína antiviral presente na hemolinfa de *Lonomia obliqua* por tecnologia de DNA recombinante em *Escherichia coli* / Dalton Giovanni Nogueira da Silva. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça.

Tese (Doutorado) – 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: Bioprospecção e biologia celular.

Versão do título para o inglês: Cloning and expression of the antiviral protein present in the hemolymph of *Lonomia obliqua* by recombinant DNA technology in *Escherichia coli*.

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

ICB/SBIB0147/2014

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

Candidato(a): Dalton Giovanni Nogueira da Silva.

Título da Tese: Clonagem e expressão de proteína antiviral presente na hemolinfa de *Lonomia obliqua* por tecnologia de DNA recombinante em *Escherichia coli*.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

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

São Paulo, 18 de novembro de 2013

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Clonagem e expressão de proteína antiviral presente na hemolinfa de *Lonomia obliqua* por tecnologia de DNA recombinante em *Escherichia coli*", protocolo nº. I-1157/13, sob a responsabilidade de Ronaldo Zucatelli Mendonça e Dalton Giovanni Nogueira da Silva, não envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica.

This is to certify that the proposal "Recombinant antiviral portein of *Lonomia obliqua* produced in a bacterial expression system", protocol nº I-1157/13, under the responsibility of Ronaldo Zucatelli Mendonça and Dalton Giovanni Nogueira da Silva, has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee, and that it does not involve breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata, in scientific research.

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por me guiar em mais um grande trabalho na minha vida, me dando força e conhecimento para concluí-lo.

A minha esposa Gabi, meu Amor, que sempre me empresta o ombro em todas as horas difíceis e também sempre comemora as conquistas.

A minha filha amor da minha vida Helena, meu “Pocote”, que tem o poder de regenerar um dia ruim com um simples sorriso, sempre disposta a ajudar.

Aos meus Pais José Carlos e Inara por todo apoio e paciência para aguentar algum desabafo, dar uma opinião ou até mesmo fornecer uma ajuda financeira, independente do sacrifício que fosse necessário.

A minha IRMÃ Carla por todo companheirismo, paz e amizade

A minha Vó Maria (*in memoriam*) que passou a vida tentando entender porque eu nunca paro de estudar e arrumo um emprego.

Ao meu sogro Rafael e minha sogra Regina e seu esposo Valter por todo apoio, nas mais variadas formas.

Ao meu amigo Vini pelas conversas que me levavam para fora da ciência;

À Prof.^a Dr.^a Rita, ao Dr. Rodrigo; a Jackie, ao Rodfrigo Araldi, ao Sérgio, a Nara (companheira de disciplinas), a Thati, a Oilita e a Dr^a Suely;

Aos secretários Fábria, Eliana e Marcos do Programa de Interunidades em Biotecnologia pela ajuda e dicas em todos os trâmites burocráticos.

As Bibliotecárias Monica e Terezinha pela ajuda na formatação e depósito do exemplar.

A Dr^a Cris e a Dr^a Isabel do Instituto Adolfo Lutz pela ajuda nos testes antivirais.

Ao Dr. Ronaldo pela orientação nesse trabalho, apoio e disposição em ajudar.

A toda equipe do laboratório de parasitologia, a Valéria, Nathalia Delazeri, Luciana, Mariana, Karina, Juliana, Natalia Isola, Renan, Natalia Verdinha, Arlete, Simone, Fernando, Ana Rita, Marina, Patricia, Eliana, Lurdinha, Carlos e Jurema.

A Dr^a Ana Carol Viegas e ao Haniel não sei se encaixo eles no laboratório eu na parte pessoal, mas sei que agradeço o apoio e a amizade.

A Dr^a Darci minha coorientadora de coração que me estendeu a mão até mais do que eu acho que merecia, me indicando diversas possibilidades para o futuro, e

toda equipe do LECZ que me ajudaram nessa etapa, em especial ao Gabriel, Diego, Fernando, Leidiane, Gabi, Livia e Marcia.

Ao Diretor do LECZ Roberto pela indicação para Laboratório de BioMol

Agradeço as aos órgãos de fomento e instituições:

A **CAPES** pela bolsa de Doutorado;

A **FAPESP** e **CNPq** pelos auxílios financeiros;

A **Universidade de São Paulo** pelo auxílio a congressos científicos.

Ao **Instituto Butantan** pela disponibilidade de estrutura para elaboração do projeto.

“As pessoas não são o que elas mostram,
mas sim o que não conseguem esconder.”

Dalton Giovanni

Dedico este trabalho...

Ao meu Bisavô Manuel da Silva (*In memorian*) e
A minha Avó Maria da Silva Lopes (*In memorian*).

RESUMO

GIOVANNI, D. N. S. **Clonagem e expressão de proteína antiviral presente na hemolinfa de *Lonomia obliqua* por tecnologia de DNA recombinante em *Escherichia coli***. 2014. 116 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Infecções virais são de grande interesse em saúde pública. Estudos com hemolinfa de insetos demonstraram a presença de princípios ativos de interesse para o desenvolvimento de novas drogas farmacológicas como antivirais. Em 2009, demonstrou-se a existência de um potente antiviral em hemolinfa de *L. obliqua*. Esta proteína purificada reduziu o título viral (TCID₅₀ ml⁻¹) do sarampo em 157 vezes, 61 vezes a do pólio vírus e 64 vezes a do H1N1 vírus da gripe. Recentemente, construiu-se um recombinante em sistema baculovírus / célula de inseto para a expressão da proteína antiviral, mostrando boa atividade antiviral, pois reduziu o título de vírus do herpes em 10⁶ vezes, da rubéola e EMC em 10⁵ vezes. No entanto, este sistema de expressão é muito caro e trabalhoso. Com isso, clonamos e expressamos esta proteína com atividade antiviral em sistema bacteriano. A sequência antiviral foi obtida por PCR com base na sequência previamente clonada em nosso laboratório e nos iniciadores utilizados foram adicionados sítios específicos de restrição (BamHI e HindIII) para a ligação com o plasmídeo pET28a. O produto de PCR e o vetor pET28a foram digeridos com as mesmas enzimas. Foi feita a ligação, onde a construção resultante foi transformada por choque térmico em *E. coli* BL21 DE3 pLysS. A proteína antiviral foi induzida com IPTG 1,0 mM, DO 0,7 e 37 °C durante 4 horas. Após expressão, a proteína foi detectada em western blot usando anticorpo anti-His e as bactérias foram então sonicadas. O sobrenadante bruto foi purificado por afinidade pela cauda de histidina por *beads* magnéticas e pela coluna HisTrap FF de 5ml, o material resultante mostrou-se tóxico para os testes por causa do imidazol presente. Entretanto as proteínas expressas apresentaram uma proteção celular, o material somente com imidazol destruía o tapete celular muito mais rápido que a mesma dose contendo antiviral junto com imidazol. Apesar da proteção, optamos por retirar o imidazol dos testes antiviral e avaliar essa proteção celular em separado. Utilizou-se a dialise sob refrigeração e corrida de gel filtração no Akta para eliminar o imidazol. Os testes antivirais foram realizados e foi feita uma titulação (TCID₅₀ ml⁻¹) com o vírus EMC, onde com 20 µg/ml de proteína mostrou uma proteção de 10000 vezes em relação ao controle. E utilizando qPCR mostrou-se uma redução dos níveis de transcrição de RNA do vírus do herpes e do vírus da rubéola em todas as diluições e inibiram totalmente a partir das diluições 10⁻⁷ e 10⁻⁴, respectivamente, mostrando um potente efeito antiviral.

Palavras-chave: Proteína Antiviral. Expressão. Clonagem. *Lonomia obliqua*. *Escherichia coli*.

ABSTRACT

GIOVANNI, D. N. S. **Cloning and expression of the antiviral protein present in the hemolymph of *Lonomia obliqua* by recombinant DNA technology in *Escherichia coli*.** 2014. 116 p. PhD Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Viral infections are of great public health interest. Insect hemolymph studies demonstrated the presence of active principles of interest for the development of new pharmacological drugs such as antivirals. In 2009, we demonstrated the existence of a potent antiviral in hemolymph of *L. obliqua*. This purified protein has reduced the viral titer (TCID₅₀ ml⁻¹) of measles 157 times, 61 times that of poliovirus and 64 times that of the H1N1 influenza virus. Recently, we constructed a recombinant baculovirus / insect cell for the expression of antiviral protein, showing good antiviral activity because it reduced the title herpes virus 10⁶ times, rubella and EMC 10⁵ times in the system. However, this expression system is very expensive and laborious. Thus, cloned and expressed this protein with antiviral activity in bacterial system. The antiviral sequence was obtained by PCR based on the sequence previously cloned in our lab and the specific primers used restriction sites (BamHI and HindIII) have been added to the connection with the pET28a plasmid. The PCR product and the vector pET28a are digested with the same enzymes. The connection, where the resulting construction was transformed by heat shock into *E. coli* BL21 DE3 pLysS was taken. The antiviral protein was induced with 1.0 mM IPTG, 0.7 DO and 37 °C for 4 hours. Following expression, the protein was detected on western blot using anti-His antibody and the bacteria were then sonicated. The crude supernatant was affinity purified by histidine tail by magnetic beads and the HisTrap FF 5 ml column, the resulting material was shown to be toxic to the present tests because imidazole. However the expressed protein showed a cell protection, the material only with imidazole destroying the cell carpet much faster than the same dose containing antiviral along with imidazole. Despite the protection, we chose to remove the imidazole of antiviral testing and evaluating this cell protection separately. We used a dialysis run under refrigeration and gel filtration in the Akta to remove imidazole. Antiviral tests were performed and a titration (TCID₅₀ ml⁻¹) was made with EMC virus, where 20 µg/ml protein showed a protection of 10 000 times compared to the control. Using qPCR and showed a reduction in the levels of RNA transcript of herpes virus and rubella virus at all dilutions and completely inhibited from dilutions 10⁻⁷ and 10⁻⁴, respectively, showing a potent antiviral effect.

Keywords: Antiviral protein. Expression. Cloning. *Lonomia oblique*. *Escherichia coli*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Número de Biofármacos licenciados pelo FDA desde 1982	22
Figura 2 - Lagarta da espécie <i>Lonomia obliqua</i> (Lepidoptera: Saturniidae)	27
Figura 3 - Hábito gregário das Lagartas <i>Lonomia obliqua</i>	27
Figura 4 - Ultraestrutura das espículas no tegumento de <i>L. obliqua</i>	28
Figura 5 - Sequência de aminoácidos da proteína antiviral obtidos por degradação de Edman.....	32
Figura 6 - Análise SDS-PAGE de cerdas, extrato de tegumento, hemolinfa e criosecção de <i>Lonomia obliqua</i>	33
Figura 7 - Mapa do vetor pET28a e sequência do sítio de clonagem e expressão. ...	36
Figura 8 - Equação para cálculo razão molar entre ligação inserto e vetor.....	37
Figura 9 - Esquema de microplaca utilizada para crescimento de clones transformantes em <i>E. coli</i> TOP 10 Invitrogen.....	38
Figura 10 - Esquema de microplaca utilizada para crescimento de clones transformantes em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	40
Figura 11 - Esquema de diluição viral do Vírus EMC em 12 poços em razão 3.....	48
Figura 12 - Sequencia teórica de AVLOEc-N-C-His / pET28a.	50
Figura 13 - Sequência teórica de AVLOEc-N-His /pET28a.	51
Figura 14 - Tabela de frequência de códons de <i>E. coli</i> presentes na sequência de AVLOEc	52
Figura 15 - Gel de agarose 2% para visualização PCR para obtenção de inserto AVLOEc-N-C-His.....	53
Figura 16 - Gel de agarose 2% para visualização PCR para obtenção de inserto AVLOEc-N-His.	53
Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose (1%) digestão enzimática pET28a e inserto AVLOEc-N-C-His.....	54
Figura 18 - Gel de agarose 1,5% para visualização da PCR de triagem dos clones dos transformantes <i>E. coli</i> TOP10.....	56
Figura 19 - Resultado obtido do sequenciamento dos clones AVLOEc-N-C-His / pET28a e provável tradução da proteína expressa.....	57
Figura 20 - Resultado obtido do sequenciamento do clone AVLOEc-N-His / pET28a e provável tradução da proteína expressa.	58

Figura 21 - Gel de agarose 1,5% para visualização da PCR de triagem dos clones dos transformantes em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS.	59
Figura 22 - Gel de poliacrilamida 15% de amostras no tempo 0 e 4 horas de indução em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS.	61
Figura 23 - Cromatograma de gel filtração de amostra não induzida de AVLOEc-N-His / pET28a.....	62
Figura 24 - Cromatograma de gel filtração de amostra não induzida de AVLOEc-N-C-His / pET28a.....	62
Figura 25 - Cromatograma de gel filtração de amostra induzida de AVLOEc-N-His / pET28a.....	63
Figura 26 - Cromatograma de gel filtração de amostra induzida de AVLOEc-N-C-His / pET28a.....	63
Figura 27 - Sobreposição de cromatogramas de gel filtração de amostras induzidas e não induzidas.	64
Figura 28 - Western Blot extrato bruto bacteriano do clone AVLOEc-N-C-His / pET28a.....	64
Figura 29 - Gel de poliacrilamida 15% de amostras antes e depois da purificação por Dynabeads.	65
Figura 30- Cromatografia em coluna de afinidade HisTag FF 7,5 ml <i>sobrenadante de primeira lavagem</i> de AVLOEc-N-C-His / pET28a.....	66
Figura 31- Gel SDS-PAGE amostras da purificação HisTrap FF AVLOEc-N-C-His..	67
Figura 32 - Cromatografia em coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL do <i>sobrenadante de primeira lavagem</i> de AVLOEc-N-C-His	68
Figura 33 - Cromatografia em coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL da <i>amostra Dyna-AVLOEc-N-C-His</i>	68
Figura 34 - Efeito citopático do <i>sobrenadante de primeira lavagem</i> em células Vero e L929	70
Figura 35 - Efeito Citopático de Dyna-AVLOEc-N-His em células Vero e L929.	71
Figura 36 - Efeito Citopático do tampão de eluição Dynabeads em células Vero e L929.	72
Figura 37 - Teste de atividade antiviral da proteína AVLOEc-N-C-His em células L929 infectadas com Vírus EMC.	74
Figura 38 - qPCR para Herpes vírus (DNA).	76
Figura 39 - qPCR para vírus da Rubéola (RNA).	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lista com os 15 biofármacos segundo Contract Pharma mais vendidos em 2011.	21
Tabela 2 - Iniciadores utilizados para amplificação e clonagem da sequência da proteína AVLOEc	34
Tabela 3 - Resultado quantitativo da PCR de triagem dos clones em <i>E. coli</i> TOP 10	56
Tabela 4 - Resultado quantitativo da PCR de triagem dos clones em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	59
Tabela 5 - Título de picornavírus (EMC) em cultivos de células L929 tratado com AVLOEc-N-C-His.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – grau Celsius

µg – micrograma (grama x 10⁻⁶)

µl – microlitro (litro x 10⁻⁶)

aa – aminoácido

AgMNPV – *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus

AVLOEc-N-C-His Recombinante Antiviral de *L. obliqua* expressa em *E. coli* com calda His N e C – Terminal

AVLOEc-N-His – Recombinante Antiviral de *L. obliqua* expressa em *E. coli* com calda His N-Terminal

BL21 (DE3) pLysS – linhagem de bactéria *E. coli*

cDNA – DNA complementar

CDS – Sequências codificadoras

Células L929 – Células de fibroblasto de camundongo – *Mus musculus*

Células SIRC – Células de córnea de coelho – *Oryctologus aniculus*

Células VERO – Células de rim de macaco verde - *Cercophitecus aethiops*

CV – Volumes de coluna

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – dexoxinucleotídeos

Dyna-GF-AVLOEc-N-C-His – AVLOEc-N-C-His purificado por Dynabeads e Gel Filtração

Dyna-GF-AVLOEc-N-His – AVLOEc-N-His purificado por Dynabeads e Gel Filtração

GCUA – Software Graphical Codon Usage Analyzer

GF-AVLOEc-N-C-His – AVLOEc-N-C-His purificado por Gel Filtração

GF-AVLOEc-N-His – AVLOEc-N-His purificado por Gel Filtração

HisTrap-D-AVLOEc-N-C-His – AVLOEc-N-C-His purificado na coluna HisTrap-FF e dialisado em H₂O

HisTrap-D-AVLOEc-N-His – AVLOEc-N-His purificado na coluna HisTrap-FF e dialisado em H₂O

HisTrap-FF-AVLOEc-N-C-His – AVLOEc-N-C-His purificado na coluna HisTrap-FF

HisTrap-FF-AVLOEc-N-His – AVLOEc-N-His purificado na coluna HisTrap-FF

HSV-1 – Herpes simplex Virus tipo 1

HSV-2 – Herpes simplex Virus tipo 2

IFN - interferon

IPTG – isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside

kb – kilobase

kDa – quilodalton

LB – Luria Bertani

LB Agar – Luria Bertani com Agar

M – Molaridade ou concentração molar

min – minuto

ml – mililitro (litro $\times 10^{-3}$)

mM – milimolar (M $\times 10^{-3}$)

OD – densidade óptica

ORF – origem de replicação

pb – pares de base

PCR – Polymerase Chain Reaction

PDB – Protein Data Bank

AVLOEc – Recombinante Antiviral de *L. obliqua* expresso em *E. coli*

RNA – Ácido Ribonucleico

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

RNA_t – Ácido ribonucleico transportador

SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SOC – meio de cultura super nutritivo com repressor catabólico

Taq – enzima DNA polimerase de *Thermus aquaticus*,

TEV protease – protease encontrada no “Tobacco Etch Vírus”

TOP10 – linhagem de bactéria *E. coli*

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Objetivos	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Biotecnologia	21
2.2 Mercado	21
2.3 Sistemas de expressão	22
2.3.1 Sistema Bacteriano	24
2.3.2 Frequência de Códon	25
2.4 Potencial Biotecnológico da Hemolinfa de Insetos	26
2.5 Lagarta <i>Lonomia Obliqua</i>	26
2.5.1 Potencial Biotecnológico derivado da <i>Lonomia obliqua</i>	28
2.6 Antivirais	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Obtenção da sequência de interesse	34
3.1.1 Desenho e Análise da sequência	34
3.1.2 Frequência de Códon	35
3.1.3 Amplificação da sequência de interesse	35
3.2 Clonagem das sequências de interesse em vetor bacteriano pET28a	35
3.2.1 Vetor pET28a	35
3.2.2 Digestão do inserto e do vetor pET28a	36
3.2.3 Purificação dos insertos e vetor por extração do gel de agarose	37
3.2.4 Dosagens dos produtos de PCR e vetores purificados	37
3.2.5 Ligação dos insertos no vetor de clonagem pET28a	37
3.2.6 Transformação das construções	37
3.2.7 Análise dos transformantes	38
3.2.7.1 Triagem por PCR	39
3.2.7.2 Sequenciamento dos clones	39
3.3 Transformação em Cepa de Expressão <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	39
3.3.1 Análise dos transformantes	40
3.3.2 Triagem por PCR	41
3.4 Indução da Expressão Proteica	41

3.4.1	Eletróforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	42
3.4.2	Deteção da proteína por Western-Blot.....	43
3.4.3	Avaliação de perfil cromatográfico em coluna de gel filtração	43
3.5	Lise bacteriana por sonicator	43
3.6	Purificação Proteica	44
3.6.1	Dynabeads His-tag Isolation NOVEX®	44
3.6.2	AKTA purifier com coluna HisTrap FF 5 ml.....	45
3.6.3	AKTA purifier com coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL	45
3.6.4	Dosagem da quantidade de proteína utilizada nos ensaios de atividade	45
3.7	Os procedimentos analíticos de células.....	46
3.7.1	Linhagens	46
3.7.2	Citotoxicidade	46
3.7.3	Determinação do título viral	47
3.8	Efeito da proteína recombinante na replicação viral	47
3.8.1	Titulação viral em cultivo de células	47
3.8.2	Avaliação da replicação viral por PCR em tempo Real quantitativa	48
3.8.2.1	<i>Rubéola</i>	48
3.8.2.2	<i>Herpes</i>	49
4	RESULTADOS	50
4.1	Obtenção da sequência de interesse	50
4.1.1	Desenho e Análise da sequência da proteína de interesse	50
4.1.2	Frequência de Códon.....	51
4.1.3	Amplificação da sequência da proteína de interesse.....	53
4.1.4	Digestão dos insertos e do vetor pET28a	54
4.1.5	Purificação dos insertos e vetor por extração do gel de agarose	54
4.1.6	Ligação dos insertos no vetor pET28a	54
4.1.7	Transformação das construções em <i>E. coli</i> TOP 10.....	55
4.1.8	Análises dos transformantes <i>E. coli</i> TOP10.....	55
4.1.8.1	<i>Triagem por PCR</i>	55
4.1.9	Sequenciamento.....	57
4.2	Transformação em Cepa de Expressão <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS.....	58
4.2.1	Análises dos transformantes <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	58
4.2.1.1	<i>Triagem por PCR</i>	58
4.3	Indução da expressão proteica	60

4.3.1	Eletróforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	60
4.3.2	Avaliação de perfil cromatográfico pelo AKTA purifier (Amersham Pharmacia Biotech) com coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL.....	61
4.3.3	Western Blot	64
4.4	Purificação Proteica	65
4.4.1	Dynabeads His-tag Isolation & Pulldown (NOVEX® - life technologies™)	65
4.4.2	AKTA purifier (Amersham Pharmacia Biotech) com coluna HisTrap FF (GE Healthcare) 5ml	66
4.4.3	AKTA purifier com coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL	67
4.5	Efeito da proteína recombinante na replicação viral	69
4.5.1	Citotoxicidade	69
4.5.2	Determinação do efeito antiviral	73
4.5.3	Reação de PCR em tempo real quantitativa.....	75
4.5.3.1	<i>Herpes</i>	75
4.5.3.2	<i>Rubéola</i>	76
5	DISCUSSÃO	78
5.1	Expressão da proteína recombinante	78
5.2	Purificação da proteína recombinante	79
5.3	Citotoxicidade	80
5.4	Antiviral.....	81
6	CONCLUSÕES	85
	REFERENCIAS	86
APÊNDICE A	- Publicação relacionada I	95
APÊNDICE B	- Publicação relacionada II	100
APÊNDICE C	- Outras publicações	112
ANEXO A	- Frequência de códons em <i>E. coli</i>	113
ANEXO B	- Lista de abreviatura de aminoácidos em 3 e 1 letras e seus respectivos códons de RNA mensageiros.....	114
ANEXO C	- Purificação de dna em gel de agarose kit minelute® gel extraction qiagen®.....	115
ANEXO D	- Preparo de células competentes	116

1 INTRODUÇÃO

O uso terapêutico de proteínas recombinantes vem sendo aplicado de modo satisfatório no tratamento de inúmeras enfermidades, o que torna a produção de proteínas heterólogas uma das áreas mais importantes e promissoras para a indústria farmacêutica (DEMAIN; VAISHNAV, 2009; FERRER-MIRALLES et al., 2009; RADER, 2008). Iniciado em meados da década de 70 e deste então diversos genes foram isolados, caracterizados e expressos em sistemas heterólogos (GLICK et al., 2009), sendo a insulina a primeira proteína terapêutica licenciada para uso humano em 1982, produzida através da tecnologia do DNA recombinante em bactérias *Escherichia coli* (JOHNSON, 1983; KEEN et al., 1980). Desde então, a cada ano, novos biofármacos são aprovados pelo FDA para uso humano e uma parcela significativa são recombinantes (RADER, 2013).

A expressão de proteínas heterólogas conta com importantes ferramentas biotecnológicas, como o desenvolvimento de linhagens celulares, o aumento de produtividade, a genômica e a proteômica, a otimização do metabolismo celular, o controle de apoptose e redução da instabilidade (REYES-RUIZ; BARRERA-SALDANA, 2006). O sistema mais utilizado para a expressão destas proteínas é o bacteriano, pois apresenta protocolos mais simples, disponibilidade de várias cepas e vetores de expressão, custos menores e altos rendimentos (JANA; DEB, 2005).

A presença de substâncias farmacologicamente ativas tem sido observada em insetos e este potencial vem sendo representado pela diversidade de proteínas e efeitos sobre o metabolismo, sendo de grande interesse industrial e acadêmico (OBBARD; DUDAS, 2014).

Recentemente, nosso grupo tem demonstrado a presença de proteínas com alto potencial antiviral e antimicrobiano na cera de ovos de carrapatos *Amblyomma cajennense* (DE LIMA-NETTO et al., 2012; LIMA-NETTO et al., 2011) e na hemolinfa de *Lonomia obliqua* (GRECO et al., 2009).

Cultivos de células de inseto suplementado com hemolinfa de *L. obliqua* tiveram sua longevidade aumentada (MARANGA et al., 2003). Souza et al. (2005) demonstraram a presença de fatores com atividade antiapoptótica capaz de evitar a apoptose induzida pela depleção de nutrientes ou por indutores químicos. Mendonça et al. (2009) demonstraram a existência de uma proteína purificada da hemolinfa capaz de aumentar em torno de 59% a produção da glicoproteína do vírus da raiva,

expressa em células de *Drosophila melanogaster* S2. No ano seguinte, Vieira et al. (2010) observaram que esta também era capaz de aumentar o nível de expressão das proteínas recombinantes VP6 e VP7 em células SF-9.

Entretanto, a obtenção desta hemolinfa é difícil devido às baixas quantidades presentes na larva. Desta forma, é necessária a utilização de outras estratégias para a obtenção destes fatores em quantidades suficientes para a continuidade do projeto.

Infecções por vírus humanos e animais tem alto impacto na saúde pública e comercial. Apesar dos muitos avanços nesta área, ainda existem poucos fármacos capaz de controlar e eliminar estas infecções. Sendo assim, o aparecimento de moléculas com atividades antivirais é essencial para o controle destas enfermidades (DELCROIX; RILEY, 2011).

Algumas informações da proteína com atividade antiviral descrita por Greco et al. (2009) obtidos na bioprospecção de proteínas antiviral da lagarta *L. obliqua* foi comparada com dados biblioteca de cDNA da *L. obliqua* de Veiga et al. (2005). Esta análise permitiu a determinação da sequência da proteína antiviral de cDNA 20-LOB/LOT/LOH/LOC-JN807330.

Com isso, uma proteína foi clonada e expressa em sistema baculovírus / célula de inseto mostrando capacidade de inibir a replicação dos vírus da encefalomiocardite (EMC) (CARMO et al., 2012). Isto demonstra o potencial da hemolinfa de *L. obliqua* no desenvolvimento de novos fármacos para o controle de viroses importantes.

O sistema baculovírus / célula de inseto foi desenvolvido para a produção de proteínas recombinantes mais complexas (que necessitam de modificações pós-traducionais) (BELZHELARSKAIA, 2011). Em contra partida, seu custo é superior e o processo de produção é mais laborioso que o sistema bacteriano o que nos levou a desenvolver este projeto.

1.1 Objetivos

Clonagem e expressão do gene codificante para a proteína com ação antiviral da lagarta *Lonomia obliqua* em sistema bacteriano e avaliação da atividade antiviral em cultivo *in vitro*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biotecnologia

A administração de proteínas produzidas em laboratório vem sendo aplicado de modo satisfatório no tratamento de inúmeras enfermidades, o que torna a produção de proteínas recombinantes uma das áreas mais importantes e promissoras para a indústria farmacêutica (DEMAIN; VAISHNAV, 2009; FERRER-MIRALLES et al., 2009). Esta tecnologia do DNA recombinante iniciou-se em meados da década de 70, deste então diversos genes foram isolados, caracterizados e expressos em sistemas heterólogos (GLICK et al., 2009), sendo a insulina a primeira proteína terapêutica licenciada para uso humano em 1982, produzida através da tecnologia do DNA recombinante em bactérias *Escherichia coli* (JOHNSON, 1983; KEEN et al., 1980).

2.2 Mercado

O mercado mundial de proteínas recombinantes para fins terapêuticos e farmacêuticos movimentou em 2007 cerca de 86 bilhões de dólares (CARMO, 2012), já em 2012 foi cerca de 96,4 bilhões de dólares, gerando um lucro em torno de 26 bilhões de dólares (ROTH, 2013). Em 2011, dos 12 produtos com maior faturamento listados no portal Contract Pharma, 11 fazem uso de DNA recombinante (**Tabela 1**).

Tabela 1- Lista com os 15 biofármacos segundo Contract Pharma mais vendidos em 2011.

Nome Comercial	Descrição	Comerciantes	Receita revenda
Humira	TNF Mab, rDNA , human	Abbott	\$7,932
Enbrel	TNF Receptor-IgG Fc, rDNA	Amgen, Pfizer	\$7,870
Remicade	TNF Mab, rDNA	J&J, Merck	\$7,157
Avastin	VEGF Mab, rDNA	Genentech/Roche	\$6,596
Rituxan	CD20 Mab, rDNA	Genentech/Roche, Biogen Idec	\$6,596
Herceptin	HER2 receptor Mab, rDNA	Genentech/Roche	\$5,770
Lantus	Insulin glargine, rDNA	Sanofi	\$5,190
Neulasta	G-CSF, rDNA , PEG-	Amgen, Roche	\$3,950
Epogen/Procrit	EPO, rDNA	Amgen, J&J	\$3,730
Lucentis	VEGF Mab Fab, rDNA	Genentech/Roche, Novartis	\$3,723
Pneumnar 13	Pneumococcal Vaccine(13)	Pfizer	\$3,330
Aranesp	EPO, darbo-, rDNA	Amgen	\$2,997

FONTE: Adaptado de (RADER, 2012).

Nos últimos dois anos houve um aumento do investimento na indústria biofarmacêutica, principalmente nas organizações de contrato de fabricação, empresas especializadas em produção de biofármacos que prestam serviços a empresas farmacêuticas. Em 2013 foi investido, por órgãos governamentais, organizações sem fins lucrativos e iniciativa privada, 19,4 bilhões de dólares no desenvolvimento de bioprodutos, a grande maioria recombinante, observando um aumento de 20% em relação a 2012. A maior parte dos novos financiamentos foi para empresas farmacêuticas e de biotecnologia de grande porte, enquanto novos financiamentos para empresas de biotecnologia menores totalizaram US\$ 4,1 bilhões. Sendo o segundo ano consecutivo que os financiamentos para pequenas empresas de biotecnologia alcançaram US\$ 4,0 bilhões (DOWNEY, 2014).

A cada ano novos biofármacos são aprovados pelo FDA para uso humano e uma parcela significativa são recombinantes. Em 2012, 8 eram recombinantes dos 18 produtos aprovados e em 2013, 5 produtos recombinantes foram aprovados (Figura 1).

Figura 1 - Número de Biofármacos licenciados pelo FDA desde 1982

Fonte: Adaptado de (RADER, 2013).

2.3 Sistemas de expressão

O primeiro passo para a produção de proteínas recombinantes é a escolha do sistema de expressão, atualmente estão disponíveis para esta finalidade inúmeros

tipos dentre bactérias, leveduras, fungos, plantas e animais transgênicos, linhagens celulares de plantas, mamíferos ou insetos (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). A expressão heteróloga de proteínas conta ainda com importantes ferramentas biotecnológicas, como o desenvolvimento de novas linhagens celulares, os processos de engenharia voltados para o aumento de produtividade, a genômica e a proteômica, a otimização do metabolismo celular, o controle de apoptose e dos estudos para redução da instabilidade (REYES-RUIZ; BARRERA-SALDANA, 2006).

O sistema bacteriano é o mais utilizado para a expressão de proteínas heterólogas. Este sistema apresenta protocolos mais simples, disponibilidade de várias cepas e vetores de expressão, custos menores e altos rendimentos (JANA; DEB, 2005). Porém, como o hospedeiro é um organismo procarionte, algumas modificações pós-traducionais não são realizadas de forma eficiente, inviabilizando a expressão de algumas proteínas mais complexas neste sistema (REYES-RUIZ; BARRERA-SALDANA, 2006). Nestes casos mesmo com elevados custos a expressão de proteínas em sistemas eucariotos tornou-se uma interessante alternativa (BUTLER, 2005).

Apesar do aumento da utilização de outros sistemas eucariotos de expressão para proteínas recombinantes, o sistema procarioto bacteriano com *Escherichia coli* continua sendo o principal hospedeiro escolhido para este fim. Em 2003 foram expressas no sistema *E. coli* aproximadamente 80% das 2983 proteínas submetidas ao banco de dados de proteínas PDB (*Protein Data Bank*) (SORENSEN; MORTENSEN, 2005). Em dezembro de 2009, com 88% das 87094 sequências depositadas no banco de dados de proteínas PDB, as bactérias encabeçam esta lista seguida pelos sistemas eucariotos com 9% (NETTLESHIP et al., 2010).

Entretanto, todo esse conhecimento acumulado não irá garantir a eficiente expressão da proteína recombinante em quaisquer sistemas. Não existe, por exemplo, um sistema de expressão eficiente para todas as proteínas recombinantes. Cada proteína apresenta um novo problema, e o alto nível de síntese tem sido otimizado em cada caso através de variações empíricas dos diferentes parâmetros (HANNIG; MAKRIDES, 1998; JANA; DEB, 2005; KHOW; SUNTRARACHUN, 2012; LEE, 1996; MCDONALD, 2011).

2.3.1 Sistema Bacteriano

Para expressão de proteínas recombinantes em sistema bacteriano, a cepa bacteriana mais comumente utilizada é a *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, pois se trata de uma linhagem modificada para otimizar a produção de proteínas recombinantes, dentre as modificações estão mutação em ompT e lon, duas proteases que podem interferir na expressão ou na purificação da proteína recombinante e no gene codificador da RNase E (rne 131), apresentando uma maior estabilidade do mRNA (INVITROGEN™, 2010; TOMAZETTO, 2006).

O plasmídeo pLysS produz lisozima de T7 para inibir o nível basal de expressão do gene de interesse, recomendado quando a proteína é tóxica ou interfere no metabolismo bacteriano, como marca de seleção confere resistência ao clorofenicol (CAMR) e contém a origem p15A. (INVITROGEN™, 2010).

Os vetores pET (“plasmid for expression by T7 RNA polimerase”), são os mais utilizados para expressão de proteínas heterólogas em *E. coli*, necessitam de uma cepa que possa produzir a T7 RNA polimerase do bacteriófago sob o controle induzível do promotor forte lacUV5. Estes vetores possuem marca de seleção pela resistência a antibióticos (ampicilina ou canamicina) e a expressão do gene é por adição de IPTG (0,1 a 1 mM), muitas vezes chegando a níveis de super expressão e favorecendo a formação de corpúsculo de inclusão (BELLÃO, 2006). Necessitando para cada caso traçar estratégias para obtenção de proteínas nas melhores condições e qualidade (SAMUELSON, 2011).

Outra alternativa para produção em *E. coli* é a utilização de uma sequência sinal fusionada ao gene de interesse a ser expresso a fim de obter um sistema com a secreção da proteína no periplasma ou com os mais recentes avanços no meio extracelular (SU et al., 2013).

O periplasma é um ambiente oxidante que contém enzimas que catalisam a formação e o rearranjo das pontes de dissulfetos, facilitando a obtenção de proteínas em sua conformação terciária correta, entretanto por ser um local com pequeno volume pode limitar a quantidade de proteína produzida (BANEYX, 1999). Obtenção de proteína expressa secretada no meio externo pelo sistema bacteriano é uma metodologia que vem ganhando cada vez mais espaço, pois procedimentos de produção e purificação são mais rápidos, sem necessidade de protocolos

dispendiosos que envolvem etapas de ruptura celular, solubilização e renaturação (SU et al., 2012; SU et al., 2013).

Em bactérias gram-negativas ainda não existe um sistema comercial eficiente para exportação de proteínas recombinantes, pois muitos fatores com seleção do peptídeo sinal, da linhagem celular e da proteína a ser secretada ainda precisam ser elucidados para uma melhor obtenção (CHOI; LEE, 2004). Os esforços para melhorar a produção vão além da secreção de proteínas, a literatura relata a co-expressão de proteínas para ajudar a translocação e de dobragem (YOON et al., 2010).

2.3.2 Frequência de Códon

Entre os organismos existe uma variação entre a frequência dos 61 códons de aminoácidos de RNA transportadores. Dentre eles cada organismo tem seus códons mais frequentemente expressos, sendo os códons principais, e os códons pouco expressos, os códons raros, os quais sua presença pode limitar a expressão heteróloga (ANGOV et al., 2011)

Em *E. coli*, os códons AGG/AGA, AUA, CUA, CGA e CCC, são de baixa frequência podendo ocasionar problemas de tradução (JANA; DEB, 2005). Com isso, durante a tradução ocorre: a substituição, deleção ou inserção de aminoácidos, troca de fase de leitura (*frameshift*) que geralmente culmina em parada prematura da tradução, levando a redução na quantidade e qualidade da proteína recombinante (ANGOV et al., 2011; CALDERONE et al., 1996; TERPE, 2006; TOMAZETTO, 2006).

Uma estratégia para resolver esse problema é co-transformação com um plasmídeo contendo a sequência do tRNA raro (CALDERONE et al., 1996). Os códons raros de arginina AGG e AGA podem ser fatores limitantes na expressão bacteriana para vários genes de mamíferos. Mas a co-expressão do gene que codifica o tRNA Arg (AGG), resulta em alto nível de expressão da proteína recombinante (CHEN; INOUE, 1994; TOMAZETTO, 2006).

Outra estratégia muito usada atualmente é otimização de códons da sequência a ser clonada, neste método, os códons raros referentes a alguns aminoácidos no organismo que será usado na expressão, são substituídos por códons mais frequentes em cada posição dentro da sequência de interesse. Com

isso garante-se que os RNA transportadores não serão limitadores durante a expressão (ANGOV et al., 2011). Em muitos casos esta estratégia aumentou os níveis de expressão tornando bem sucedido o resultado, entretanto, em alguns casos a produção passou a formar corpúsculos de inclusão necessitando de complexos processos de renaturação (ANGOV et al., 2008; HANNIG; MAKRIDES, 1998; MAKRIDES, 1996).

2.4 Potencial Biotecnológico da Hemolinfa de Insetos

Na hemolinfa de insetos tem sido observado a presença de substâncias farmacologicamente ativas com efeitos enzimáticos (GUERRERO et al., 1999; HAMDAOUI et al., 1998; JIANG et al., 1999; MARANGA et al., 2003; ROSENFELD; VANDERBERG, 1998; SHIOTSUKI et al., 2000; YAMAMOTO et al., 1999), hormonais (HUBERMAN et al., 2000; JONES et al., 1993; KURATA et al., 1994; LIN et al., 1998), com ação antimicrobiana e antifúngica (GROSS et al., 1998; JOHNS et al., 1998; LANZ-MENDOZA et al., 1996; LOWENBERGER et al., 1999; ZHU et al., 2000) e anti congelante (PETERS et al., 1993). O potencial de estudo da hemolinfa é representado pela diversidade de proteínas e efeitos sobre o metabolismo, sendo de grande interesse industrial e acadêmico investir em estudos envolvendo a mesma para produção de proteínas heterólogas com potenciais farmacológicos. Em outros trabalhos, uma proteína presente na hemolinfa do bicho da seda (*Bombix mori*) foi capaz de aumentar a replicação do baculovírus recombinante BmNPV (CPd-luci, possui o gene da luciferase sob controle do promotor da poliedrina) em aproximadamente 10.000 vezes (KANAYA; KOBAYASHI, 2000) demonstrando o papel que determinadas moléculas possuem na regulação da produção de outras proteínas.

2.5 Lagarta *Lonomia Obliqua*

Dentre os insetos, as lagartas da espécie *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae) (Figura 2), são conhecidas como “taturanas” (do tupi guarani “semelhante a fogo”) e possuem uma grande importância médica onde o contato com a sua fase larval pode causar acidentes graves, podendo evoluir de queimação

local até a morte devido a sua intensa ação hemorrágica, caso não seja administrado o soro antilonômico (CARMO, 2012; WEN; DUARTE, 2003).

Figura 2 - Lagarta da espécie *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae)

Fonte: (CARMO, 2012)

As lagartas são conhecidas por seu hábito gregário (Figura 3), vivendo em colônias sobre troncos de árvores nas posições mais baixas a sombra durante o dia mimetizando o ambiente, o que facilita a ocorrência dos acidentes, os quais acontecem quando uma pessoa encosta no tronco sem notar a presença das lagartas (CARMO, 2012; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2013).

Figura 3 - Hábito gregário das Lagartas *Lonomia obliqua*.

Fonte: (CARMO, 2012)

Estes animais possuem o corpo revestido por um epitélio secretor e composto externamente por inúmeras espículas (Figura 4), as quais apresentam um papel fundamental na defesa do animal, pois penetram na superfície de contato do inimigo, sofrendo ruptura e injetando o veneno. O hábito gregário potencializa a defesa, uma vez que o contato acaba sendo com mais lagartas ao mesmo tempo aumentando a quantidade de veneno injetada na vítima (VEIGA, 2005).

Figura 4 - Ultraestrutura das espículas no tegumento de *L. obliqua*.

Legenda: A - detalhe de uma espícula íntegra; B - visão geral da região dorsal do tegumento com as espículas. Fonte: (VEIGA, 2005).

Os sintomas no geral apresentados pelas vítimas são: hemorragias, hematomas, hematúria, insuficiência renal aguda e, em casos graves podendo levar a morte (CARRIJO-CARVALHO; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2007; PINTO et al., 2010).

2.5.1 Potencial Biotecnológico derivado da *Lonomia obliqua*

A lagarta *Lonomia obliqua* apresenta diversas substâncias farmacologicamente ativas, duas destas proteínas foram isoladas do veneno das cerdas desta lagarta, a Lopap e a Losac: a Lopap, (*L. obliqua* prothrombin activator protease ou proteína ativadora de protombina), é uma lipocalina que demonstrou capacidade de prolongamento do tempo de coagulação do sangue através da depleção do fibrinogênio (REIS, FARSKY, et al., 2001; REIS, PORTARO, et al., 2001). Esta proteína já foi produzida de forma recombinante (REIS et al., 2006), sendo que, patentes relacionadas já foram depositadas com indicação desfibrinante, uso em kits diagnósticos, citoproteção ou como agentes biotecnológicos.

Por outro lado, a hemolinfa da *L. obliqua* também contém substâncias de alto interesse medicamentoso. Maranga et al. (2003) demonstraram que cultivos de

células de inseto suplementado com hemolinfa de *L. obliqua* tiveram sua longevidade aumentada e aumento da população celular em 3 vezes antes de atingir a fase estacionária do cultivo. Esta proteína de 51 kDa foi purificada e caracterizada, sendo capaz de evitar a apoptose induzida pela depleção de nutrientes ou por indutores químicos como Actinomicina D (SOUZA et al., 2005).

Alvarez Flores et al. (2006) descreveram a Losac (*L. obliqua* Stuart-factor activator ou ativador de fator X), uma proteína com 45 kDa obtida a partir do veneno da *L. obliqua*, induziu em cultivos de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) maior proliferação e a inibição de apoptose, apresentando também um fator pró-coagulante. Heinen et al. (2014) mostrou que o veneno de *L. obliqua* aumenta a viabilidade de linhagens celulares de tumores U138-MG e HT-29, entretanto, inibe a viabilidade de células não tumorais V-79. Já a proteína antiapoptótica presente na hemolinfa caracterizada por Souza et al. (2005) não apresentou efeito sobre as linhagens tumorais, porém para as células V-79 não tumorais previamente tratada com veneno de *L. obliqua* foi capaz de aumentar a proliferação celular.

Mendonça et al. (2009) demonstraram que a proteína purificada da hemolinfa da lagarta foi capaz de aumentar em torno de 59% a produção da glicoproteína do vírus da raiva, expressa em células de *Drosophila melanogaster* S2. No ano seguinte, Vieira et al. (2010) observaram que a mesma proteína também era capaz de aumentar o nível de expressão das proteínas recombinantes VP6 e VP7 em células SF-9.

A hemolinfa da *L. obliqua* foi capaz de aumentar em até 6443,91 vezes a replicação do baculovírus *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) em células de inseto SF9, amplamente utilizado como biopesticida para o controle de praga da lagarta da soja (SOUZA et al., 2014). Greco et al. (2009), demonstraram também a existência de uma proteína capaz de reduzir a replicação do vírus da influenza e sarampo.

2.6 Antivirais

Infecções por vírus em humanos ou animais causam um alto impacto no âmbito comercial e na saúde pública. E os fármacos existentes, capazes de controlar ou até eliminar estas infecções são poucos, apesar do grande avanço nesta área. Desta forma, moléculas antivirais se tornam essenciais para o controle destas enfermidades. Cerca de 40 compostos antivirais já estavam em fase de teste, em 2010 (DELCROIX; RILEY, 2011), pois o desenvolvimento de agentes antivirais é de grande importância, uma vez que muitas cepas virais afetam milhões de pessoas no mundo, como por exemplo, SARS, coronavírus, os vírus da gripe H5N1 e H1N1. Atualmente o mundo está passando por um grande surto causado por 5 vírus da família Filoviridae conhecidos com Ebola vírus; *Zaire ebolavirus*, *Sudan ebolavirus*, *Bundibugyo ebolavirus*, *Tai forest ebolavirus* e *Reston ebolavirus*. São extremamente agressivos e devastadores levando a morte de 40 a 90% dos infectados dependendo da espécie viral (WONG et al., 2014).

Diferentes estudos mostram que estes compostos antivirais podem ser desenvolvidos através de diversos gêneros, como por exemplo, os invertebrados que, apesar de um sistema imunológico simples e necessidade de resposta imune adquirida, é capaz de combater uma ampla variedade de parasitas e patógenos, pois seu sistema reconhece pequenos e grandes invasores, fagocitando-os e encapsulando-os respectivamente. A hemolinfa destes insetos também contém uma variedade de proteínas antibacterianas, antifúngicas e antivirais (COTTER; WILSON, 2002).

Diversas espécies de insetos possuem em sua hemolinfa proteínas, peptídeos ou outros compostos capazes de inibir o crescimento de micro-organismos tais como fungos, bactérias e vírus. Atividades contra estes últimos vêm sendo estudadas há algum tempo, como a fenol oxidase da hemolinfa de *Heliothis virescens*, que apresenta este tipo de atividade contra diferentes vírus, incluindo HIV-1 que pode infectar humano e até mesmo aqueles que não infectam hospedeiros destes insetos (OURTH; RENIS, 1993; POPHAM et al., 2004).

Entretanto, a obtenção desta hemolinfa é difícil devido às baixas quantidades presentes na larva. Fica evidente que a sua utilização “*in natura*” não é viável para a purificação de compostos para fins farmacológicos. Desta forma, é necessária a

utilização de outras estratégias para a obtenção destes fatores em quantidades suficientes para estudos.

Podemos citar também os produtos com efeito antiviral obtidos a partir dos artrópodes. Estudos demonstram que estes efeitos se devem principalmente pelo fato de que os insetos são encontrados em todo o ecossistema, acreditando-se que estes tenham desenvolvido sistemas de proteção para sobrevivência, o que estimula ainda mais as pesquisas de novos agentes terapêuticos (CHERNYSH et al., 2002).

Hiraki et al. (1997) demonstraram a presença de uma molécula com atividade antiviral obtida das fezes de lagartas capaz de combater o HSV (vírus herpes simplex tipo-1), HVJ (vírus Sendai) e o HIV (vírus da imunodeficiência adquirida).

Chernysh et al. (2002) purificaram uma proteína com 12,65 kDa da hemolinfa de *Calliphora vicina* capaz de controlar a infecção viral intracelular e inibir a replicação do vírus da influenza A e B, desencadeando respostas intracelulares quando adicionada antes da infecção do vírus, agindo de forma semelhante ao interferons em vertebrados.

O própolis, material resinoso produzido por abelhas, possui propriedades terapêuticas como atividade anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, imunomodulatória e antiproliferativa (HEINEN; DA VEIGA, 2011). O extrato de própolis possui atividade antiviral contra o calicivírus felino (FCV), adenovírus canino 2 (CAV-2) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV), conforme demonstraram os estudos de Cueto et al. (2011).

Além dos insetos, também foi encontrada atividade antiviral de amplo espectro contra DNA encapsulados e não encapsulados e vírus RNA em extratos de tecidos de crustáceos, sendo que esta atividade provavelmente está relacionada a múltiplos inibidores contidos nos extratos (PAN et al., 2000). A atividade antiviral também foi descrita na hemolinfa de ostras (OLICARD et al., 2005).

Recentemente identificamos uma proteína (AVLO) de aproximadamente 20 kDa, purificada da hemolinfa de *L. Obliqua*, capaz de inibir a replicação, reduzindo o título viral (TCID₅₀ ml⁻¹) do sarampo, pólio e H1N1 em 157, 61 e 64 vezes quando adicionado a culturas uma hora antes da infecção (GRECO et al., 2009).

Algumas informações da proteína com atividade antiviral descrita por Greco et al. (2009) obtidos na bioprospecção de proteínas antiviral da lagarta *Lonomia obliqua* foi comparada com dados biblioteca de cDNA da *L. obliqua* de Veiga et al.

(2005). Esta análise inferiu-se que a proteína com atividade antiviral poderia ser originada do cDNA 20-LOB/LOT/LOH/LOC* (Figura 5 e Figura 6).

Com isso, uma proteína foi clonada e expressa em sistema baculovírus / célula de inseto demonstrando capacidade de inibir a replicação dos vírus da encefalomiocardite (EMC) (CARMO et al., 2012). Inibiu também a replicação do vírus da Rubéola e Herpes (CARMO et al., 2014). Isto demonstra o potencial da hemolinfa de *L. obliqua* no desenvolvimento de novos fármacos para o controle de viroses importantes como a influenza.

Figura 5 - Sequência de aminoácidos da proteína antiviral obtidos por degradação de Edman.

Band	Edman degradation result	Cluster match ¹	Tissue ²	Putative function
1-LOB	TKstQKiCvL	140	B	lectin
1-LOB	GKhpPKGQVA/DLPxLE	24/433	T	troponin T/myosin
1-LOB	NTPiLE/DTDiLE	184/35	T/B	unknown
1-LOB	DVPpLE/DKDdLE	260/222	T/B	chaperone
2-LOH	SVVEKKkNtnK	278	B	chaperone/endopeptidase
2-LOH	SAVGKKtvmRV	263	T	cytochrome P450
3-LOH	GKSXYKIXVASXYLKAXQ	-	-	-
4-LOH	SXiQND	-	-	-
5-LOH	TAXIEDN	-	-	-
6-LOH	TAPIXQXKVL	-	-	-
7-LOB	SHqKLQhFLK	104	B	pheromone binding protein
7-LOB	DHDILpsCLR	364	T	ubiquitin-ligase
8-LOB/LOH/LOC	TETDLQRILRdgNDqFtaKM	42	T	serpin
8-LOH	FHYFGHEYDRtALGDAIdKA	247	T	serpin
9-LOB	TETIAQDy	371	T	laminin
9-LOB	VPVEKIPVKSQ / aGVErsVIIQDQ / NEDLLQ	37/262	B	hemolin/endopeptidase
10-LOT	NEDLLQ	338	B	unknown
11-LOB	VEgEAEDPsKNdeS / gGTEAaFGdwPwMVyI	12	B	trypsin
12-LOH	SENQVQNIVTDQNINLAKQV	-	-	-
13-LOH	SHAFxVNDVXXEQ	-	-	-
14-LOH	NVGFDVSIQEVFXA	-	-	-
15-LOB	APAPDaAe	469	T	unknown
16-LOB	TVIKDIAK / AVkEakAK	129/221	T	lectin/ribosomal protein
17-LOC	DVGQSVXXLXQ	-	-	-
18-LOH	DIEIPNdKREQLKqILTeQc	352	T	hemolymph glycoprotein
19-LOB/LOT/LOH/LOC	DVAVDGAaPDMKANSKEDMN	274	T/B	lipocalin
20-LOB/LOT/LOH/LOC	EENELIGSGHLIAITFPRLQK	375	T	transferrin
21-LOB	SEQYTNKYDNTNLDHILGND	22	B	chemosensory protein
21-LOT	SLYYSNepy	288	B	unknown
21-LOT	fVKYTsQyD/ALYcTiQgD	203/494	T	unknown
22-LOB/LOH	DENYTTENDXVDIEAVVKDP	-	-	-
23-LOH	DvNLTNLkAQAaArQrAcL	333	B	protease inhibitor
24-LOT/LOC	MqIFVKILT	451/352	T/B	ubiquitin
25-LOB	SkSYErLEVtVTeI	433	T	myosin

¹Clusters from cDNA library, see Table 1

²Tissue used in the cDNA library, T: tegument, B: bristle

Fonte: (VEIGA et al., 2005).

Figura 6 - Análise SDS-PAGE de cerdas, extrato de tegumento, hemolinfa e criosecção de *Lonomia obliqua*.

Legenda: (LOB) cerdas; (LOT) tegumento; (LOH) hemolinfa; (LOC) criosecção. Fonte: (VEIGA et al., 2005).

O sistema baculovírus / célula de inseto foi desenvolvido para a produção de proteínas recombinantes mais complexas (que necessitam de modificações pós-traducionais). Neste sistema, o vírus recombinante é utilizado para infectar as células de insetos. Durante a infecção, o baculovírus recombinante é replicado e as proteínas exógenas são produzidas (BELZHELARSKAIA, 2011). Em contra partida, seu custo é superior e o processo de produção é mais laborioso que o sistema bacteriano o que nos levou a desenvolver este projeto.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção da sequência de interesse

3.1.1 Desenho e Análise da sequência

As montagens das duas construções em vetor de expressão bacteriano foram denominadas como: AVLOEc-N-C-His, recombinante antiviral de *Lonomia obliqua* em *E. coli* com cauda de histidina na porção C e na porção N terminal; e AVLOEc-N-His recombinante antiviral de *Lonomia obliqua* em *E. coli* com cauda de histidina somente na porção N terminal. Para obtenção da sequência de DNA foi utilizado como molde a sequência já clonada em pFastBac™ Invitrogen™ (Life Technologies do Brasil Ltda, São Paulo, S.P., Brasil) (CARMO et al., 2012) e com o Software de análise de sequências BioEdit versão 7.0.5.3 (TIPPMANN, 2004), foi desenhado os iniciadores incluindo nas extremidades sítios para enzimas de restrição (Tabela 2) compatíveis com o vetor de expressão pET28a™ Novagen (Novagen Genética Ltda., Itapira, S.P., Brasil) (Figura 7), foi checada a matriz de leitura, simulada a tradução e calculado peso e ponto isoelétrico das proteínas esperadas.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados para amplificação e clonagem da sequência da proteína AVLOEc

Sentido	Sequência
AVLOEc-N-C-His	
<i>Sense AVLOEc-N-C-His</i>	5' -GAG GGATCC ATGTTGAAGTTTATAATTC-3'
<i>Antisense AVLOEc-N-C-His</i>	5' -GAG AAGCTT TTA GTGATGGTGATGGTGATC GCCCTGAAAATACAGGTTTTC ACTCAAATCGCATAACAG -3'
AVLOEc-N-His	
<i>Sense AVLOEc N-His</i>	5' -GAG GGATCC GAAAACCTGTACTTCCAGGGC ATGTTGAAGTTTATAATTC -3'
<i>Antisense AVLOEc-N-His</i>	5' - CTGTTATGCGATTTGAGTTAAGCTT CTC -3'

Legenda: **Cinza** sequência de ancoragem para amplificação; **Vermelho** sítio de restrição BamHI; **Azul** Sítio de restrição HindIII; **Vermelho** Cauda de Histidina e **Azul** Sítio TEV.

3.1.2 Frequência de Códon

A análise dos códon presentes na sequência AVLOEc quanto a sua frequência em *E. coli* (ANEXO A) foi realizado com o Software: *Graphical Códon Usage Analyser (GCUA)* version 2.0 (FUHRMANN et al., 2004).

3.1.3 Amplificação da sequência de interesse

Para a amplificação do gene da AVLOEc, foi realizado PCR com a *Taq Platinum Brazilian* Invitrogen, com 0,2 µl de Taq, 2,5 µl de tampão, 0,75 µl de MgCl₂, 1 µl de dNTP 10 mM, 1 µl de cada par de iniciadores da Tabela 2 e 1,0 µl de pFastBacTM1-AVLO como molde. O volume foi completado para um volume final de 25 µl de reação com H₂O MilliQ autoclavada.

Um ciclo inicial 94 °C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto e 30 segundos, 55 °C por 1 minuto e 30 segundos e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, finalizando com um ciclo de 72 °C por 10 minutos para extensão final.

As amostras foram visualizadas em gel de agarose 1,5% contendo SYBRTM Invitrogen em cuba horizontal e foto documentado utilizando equipamento MultiDoc-It UVP.

3.2 Clonagem das sequências de interesse em vetor bacteriano pET28a

3.2.1 Vetor pET28a

Para as clonagens, foi utilizado o vetor de expressão pET28a NovagenTM, que apresenta uma configuração N-terminal His•Tag®/thrombin/T7•Tag® mais uma opcional sequência C-terminal His-Tag. Possui sítio para iniciadores T7 promoter e T7 terminator que amplificam uma sequência de 318 pb quando vazio (Figura 7).

Figura 7 - Mapa do vetor pET28a e sequência do sítio de clonagem e expressão.

Legenda: **Códon de Partida**, **Sítio de Trombina**, **Cauda de Histidina**, **Sítio BamHI**, **Sítio EcoRI**, **Sítio TEV**, **Códon de Parada**, **Sítio de HindIII**, **Sítio KpnI**, **Sítio XhoI** e **Iniciadores T7 Promoter e T7 terminator respectivamente**. Fonte: adaptado de (NOVAGEN, 2005).

3.2.2 Digestão do inserto e do vetor pET28a

Os insertos obtidos no item 3.1 e o vetor de expressão pET28a foram digeridos com as enzimas HindIII e BamHI Biolabs (Biolabs, Uniscience, São Paulo, SP, Brasil). Seguindo os seguintes protocolos para digestão: Insertos, 12 µl de DNA, 12 µl de H₂O MilliQ autoclavada, 3 µl NEBuffer 3.1, 1 µl de enzima BamHI e 2 µl de enzima HindIII com volume final de 30 µl; Vetores, 24 µl de pET28a ressuspendido em H₂O MilliQ, 3 µl NEBuffer 3.1, 1 µl de enzima BamHI e 2 µl de enzima HindIII com volume final de 30 µl, incubou-se à 37 °C por 2 horas.

Um controle de reação para cada enzima BamHI e HindIII foi realizado, digerindo 10 µl de Vetor pET28a vazio, 7 µl de H₂O MilliQ autoclavada, 2 µl NEBuffer 3.1 e 1 µl de enzima com volume final de 20 µl, A reação foi incubada à 37 °C por 2 horas junto com as reações acima.

3.2.3 Purificação dos insertos e vetor por extração do gel de agarose

Após a digestão todo o volume das reações foi aplicado em gel de agarose de 1% e as bandas correspondentes ao tamanho dos insertos e vetor foram recortadas com auxílio de um bisturi e purificadas com o kit MinElute® Gel Extraction (QIAGEN®, GmbH, Hilden, Germany), seguindo especificações do fabricante (ANEXO C).

3.2.4 Dosagens dos produtos de PCR e vetores purificados

O volume de 2 µl de cada amostra purificada foi quantificado em Espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000, Unisciense, São Paulo, SP, Brasil) as amostras foram lidas em 230, 260 e 280 nm e a concentração foi expressa em ng/µl (pela multiplicação do valor da absorbância pelo coeficiente de extinção). Ainda foi determinada a pureza do DNA obtido pela razão A260/A280

3.2.5 Ligação dos insertos no vetor de clonagem pET28a

Foram montadas reações de ligação seguindo a equação descrita na Figura 8 com razão molar 3:1 (inserto/vetor), ou seja, 3 vezes mais cópias de inserto que cópias de vetor; utilizou-se a enzima T4 DNA ligase Invitrogen em um volume final de 20 µl, onde 16,0 ng de Inserto, 50 ng de vetor, 4 µl de 5X DNA Ligase Reaction Buffer, 1 µl T4 DNA Ligase e 9 µl de H₂O *MiliQ* autoclavada, incubada overnight a 16 °C.

Figura 8 - Equação para cálculo razão molar entre ligação inserto e vetor

$$\frac{50,0 \text{ ng do vetor} \times \text{tamanho do Inserto (kb)}}{\text{tamanho do Vetor pET28a (kb)}} \times \text{Razão Molar} \frac{\text{Inserto}}{\text{Vetor}} = \text{ng do inserto}$$

Fonte: Adaptado de (SAMBROOK; RUSSELL, 2001)

3.2.6 Transformação das construções

Um volume de 10 µl do produto de cada reação de ligação *AVLOEc-N-C-His* / pET28a, *AVLOEc-N-His* / pET28a e 25 ng (1 µl) de vetor pET28a vazio, como controle de transformação, foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* TOP

10 (Invitrogen) quimiocompetentes (ANEXO D). A mistura foi incubada em gelo por 30 minutos, submetida a “choque térmico” a 42 °C por 1 minuto e novamente incubada em gelo por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se de 400 µl de meio enriquecido SOC em cada transformação, incubando a 37 °C por 60 minutos a 250 rpm. Estes cultivos foram plaqueados com esferas de vidro em meio LB- Agar, contendo 50 µg/ml de canamicina, IPTG e X-GAL. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas.

3.2.7 Análise dos transformantes

Após a incubação, as colônias brancas dos transformantes foram selecionadas para triagem. Foram semeadas em microplacas de 96 cavidades com 150 µl de meio LB com canamicina (50 µg/ml) crescidas, a 37 °C sem agitação, *overnight*. As colônias foram semeadas de acordo com a Figura 9, os 37 poços amarelos, nas linhas A a D foram semeados clones de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a e os 40 poços verdes nas linhas E a H foram semeados clones de *AVLOEc-N-His* / pET28a, Os poços em vermelho foram deixados de controle negativo de manipulação contendo somente meio de cultura, em azul são poços não utilizados. Após incubação, acrescentou-se 50 µl de glicerol em cada poço para armazenamento em ultrafreezer -80 °C.

Figura 9 - Esquema de microplaca utilizada para crescimento de clones transformantes em *E. coli* TOP 10 Invitrogen.

Legenda: Os Poços amarelos nas linhas A a D triagem dos clones *AVLOEc-N-C-His* / pET28a e os poços verdes nas linhas E a H triagem dos clones *AVLOEc-N-His* / pET28a; Os poços em vermelho são controles negativos somente meio de cultura; em azul, poços não utilizados. Fonte: Giovanni, DNS 2014.

3.2.7.1 Triagem por PCR

As reações de PCR para a confirmação dos clones *AVLOEc-N-C-His* / pET28a e *AVLOEc-N-His* / pET28a, utilizando o par de iniciadores T7 *Promoter* e T7 *Terminator* com a *Taq Platinum Brazilian*, foram realizadas seguindo as especificações do fabricante. Para isso foi adicionado a uma placa de PCR de 96 poços 5 µl de caldo bacteriano dos crescidos *overnight* referente aos poços amarelo, verde e vermelho da Figura 9, em azul os controles (100 ng de pET28a vazio purificado como controle positivo e H₂O *MiliQ* autoclavada como controle negativo). A placa foi incubada no termociclador Mastercycler® Gradient Eppendorff com o seguinte programa; Uma etapa inicial de 94 °C por 10 minutos; seguida de 35 ciclos de 94 °C por 90 segundos, 50 °C por 90 segundos e 72 °C por 5 minutos; finalizando com uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. Posteriormente a reação foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

3.2.7.2 Sequenciamento dos clones

Selecionou-se 3 clones positivos de cada construção e fez-se o crescimento em 10 ml de meio LB com canamicina (50 µg/mL) à 37 °C, 200 rpm *overnight*. Utilizou-se 8 ml para extração do DNA plasmidial com kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System – Promega (Promega do Brasil, São Paulo, S. P., Brasil) segundo recomendações do fabricante, os 2 ml restantes foram armazenados em ultrafreezer -80 °C em alíquotas de 200 µl à 20% de Glicerol.

O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático ABI 3100™ DNA sequencer (Life Technologies do Brasil Ltda, São Paulo, S.P., Brasil) e as sequências analisadas utilizando o programa BioEdit (versão 7.0.5.3).

3.3 Transformação em Cepa de Expressão *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

Para transformação foi utilizado 50 ng de cada construção *AVLOEc-N-C-His* / pET28a e *AVLOEc-N-His* / pET28a confirmadas por sequenciamento e 50 ng de vetor pET28a vazio como controle de transformação, foram utilizadas bactérias *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Invitrogen quimiocompetentes (ANEXO D). A mistura foi incubada em gelo por 30 minutos, submetida a “choque térmico” a 42 °C por 1

minuto e novamente incubada em gelo por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 400 μ l de meio enriquecido SOC Invitrogen em cada transformação, incubando a 37 °C por 60 minutos a 250 rpm. Estes cultivos foram plaqueados com esferas de vidro em meio LB- Agar, contendo 50 μ g/ml de canamicina, 10 μ g/ml de clorofenicol, 40 μ g/ml de IPTG e 100 μ g/ml de X-GAL Invitrogen. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas.

3.3.1 Análise dos transformantes

Após a incubação, as colônias brancas dos transformantes foram selecionadas para triagem. Foram semeadas em microplacas de 96 cavidades com 150 μ l de meio LB com canamicina (50 μ g/ml) e clorofenicol (10 μ g/ml), a 37 °C sem agitação *overnight*. As colônias foram semeadas de acordo com a Figura 10, os poços verdes, nas colunas 1,2,7 e 8 foram semeados clones de *AVLOEc-N-His* / pET28a e os poços amarelos, nas colunas 3,4,9 e 10 foram semeados clones de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a. Os poços em vermelho foram deixados de controle negativo de manipulação contendo somente meio de cultura, em azul, poços não utilizados. Após incubação, acrescentou-se 50 μ l de glicerol em cada poço para armazenamento em ultrafreezer -80 °C.

Figura 10 - Esquema de microplaca utilizada para crescimento de clones transformantes em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

Legenda: Poços Verdes, *AVLOEc-N-His* / pET28a colunas 1,2,7 e 8; poços amarelos *AVLOEc-N-C-His* / pET28a colunas 3,4,9 e 10; Os poços em vermelho são controles negativos somente meio de cultura; em azul, poços não utilizados. Fonte: Giovanni, DNS 2014

3.3.2 Triagem por PCR

As reações de PCR para a confirmação dos clones *AVLOEc-N-C-His* / pET28a e *AVLOEc-N-His* / pET28a, utilizando o par de iniciadores T7 *Promoter* e T7 *Terminator* com a *Taq Platinum Brazilian* Invitrogen, foram realizadas seguindo as especificações do fabricante. Para isso foi adicionado a uma placa de PCR de 96 poços 5 µl de caldo bacteriano dos crescidos *overnight* referente aos poços verde, amarelo e vermelho da Figura 10, em azul os controles (100 ng de pET28a vazio purificado como controle positivo e H₂O *MiliQ* autoclavada como controle negativo). A placa foi incubada no termociclador Mastercycler® Gradient Eppendorff (Bioresearch, São Paulo, SP, Brasil) com o seguinte programa; Uma etapa inicial de 94 °C por 10 minutos; seguida de 35 ciclos de 94 °C por 90 segundos, 50 °C por 90 segundos e 72 °C por 5 minutos; finalizando com uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. Posteriormente a reação foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

3.4 Indução da Expressão Proteica

A indução da expressão proteica foi feita a partir de clones recombinantes em *AVLOEc-N-C-His* / pET28a e *AVLOEc-N-His* / pET28a confirmadas por sequenciamento e transformadas em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Optou-se por essa linhagem por apresentar algumas características importantes como a deleção de genes que codificam proteases e uma mutação responsável pela redução da degradação de mRNA aumentando a estabilidade de transcrição do mRNA e consequentemente a síntese proteica (NOVAGEN, 2005).

Uma alíquota de 10 µl (mantido a -80 °C) foi inoculada em 10 ml de meio LB com canamicina (50 µg/ml) e cloronicol (10 µg/ml) para o escalonamento do cultivo, incubado a 37 °C sob agitação a 200 rpm, *overnight*.

Foram adicionados 1,5 ml do cultivo em cada erlenmeyer contendo 100 ml de meio LB com canamicina (50 µg/ml) incubados a 37 °C a 250 rpm. Monitorou-se a densidade óptica (DO) a 600 nm até a taxa de multiplicação atingir aproximadamente uma DO entre 0,6 a 0,8.

Após atingir a DO, retirou-se uma alíquota de 4 ml de cada frasco como tempo zero de indução, e em seguida foi adicionado 1 mM IPTG Invitrogen estéril,

incubados sob agitação de 250 rpm a 37 °C por 4 horas. Retirou-se mais uma alíquota de 4 ml de cada frasco como tempo de indução 4 horas. Em seguida, o restante dos caldos bacterianos foi centrifugado a 11000 g por 10 minutos, descarte do sobrenadante e o pellet foi armazenado em ultrafreezer -80 °C até o uso.

3.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

As amostras coletadas no item 3.4, tempo 0 e 4 horas de indução foram centrifugadas a 10000 g por 2 minutos e ressuspendidas em 100 µl de fosfato de sódio 50 mM pH 7,8. 40 µl de cada amostra foi diluída em 20 µl de uma solução com mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 2%, e glicerol 10% com posterior aquecimento das mesmas por 5 minutos a 100 °C.

Para a realização do SDS-PAGE foi utilizada a metodologia descrita por Laemmli (1970). Foi preparado um gel de corrida de poliacrilamida a 15% (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 dodecil sulfato de sódio (SDS) Sigma (*Sigma-Aldrich*, Chicago, Illinois, EUA) 10%, 0,1 ml de perulfato de amônio Serva (Unisciense do Brasil, São Paulo, S. P. Brasil) 10%, 0,004 ml de Temed (N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine) Merck (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha), e 2,3 ml de água destilada.

O gel de empacotamento foi preparado a uma concentração de 4% (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) com 0,75 mm de espessura montado em cuba vertical de eletroforese modelo Mini-protean Bio-Rad (Bio-Rad, Belo Horizonte, Minas Gerais, São Paulo). Foram aplicados 20 µl de amostra, com a corrida a 100 Volts e temperatura ambiente, por aproximadamente 120 minutos com tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 3,5 mM)

Após a corrida, o gel foi corado com *Plus One Coomassie Tablets, PhastGel Blue R-350* GE Healthcare (GE Healthcare, Amersham Place, Amersham HP7 9NA, Reino Unido). Deixou-se o gel no corante Coomassie blue, overnight. No dia seguinte o gel foi retirado da solução corante e incubado na solução descorante

(Metanol 100 ml, Ácido Acético Glacial 70 ml, água destilada q.s.p. 1000 ml) sob agitação, trocando a solução de descorante até a visualização das bandas.

3.4.2 Detecção da proteína por Western-Blot

O extrato bruto bacteriano foi aplicado a um gel de eletroforese SDS-PAGE 15%, conforme item 3.4.1. Em seguida, o gel foi submetido a um processo de transferência das amostras para membrana de nitrocelulose com voltagem de 200 Volts, sob refrigeração e análise por Western Blot.

As membranas foram bloqueadas por 2 horas em solução de PBS suplementada com leite desnatado 10% (m/v) seguido de 3 lavagens de 5 minutos com PBS tween 0,05% (PBST) e incubadas por 60 minutos a temperatura ambiente com o anticorpo anti-histidina GE Healthcare. As bandas foram reveladas após incubação da membrana com anticorpo anti IgG (camundongo) conjugado com HRP (*Horseradish Peroxidase*) GE Healthcare.

3.4.3 Avaliação de perfil cromatográfico em coluna de gel filtração

Para a determinação do perfil cromatográfico do lisado bacteriano total induzido e não induzido fez-se diversas corridas com 100 µl de amostra, visando identificar a fração contendo a proteína recombinante. Estas amostras foram aplicadas a colunas de gel filtração Superdex™75 10/300GL em um cromatógrafo de alta eficiência Akta Purifier GE Healthcare. Utilizou-se um fluxo de 0,5 ml por minuto em uma lavagem de 1,5 colunas (36 ml) com fosfato de sódio 20 mM.

3.5 Lise bacteriana por sonicator

Os pellets resultantes da indução item 3.4 foram ressuspensos em fosfato de sódio 50 mM pH 7,8.

As células foram lisadas com auxílio de um sonicator modelo Sonifier 250 da marca Branson em banho de gelo utilizando 2 ciclos de 5 minutos com pulsos de 5 segundos e intervalo de 1 segundo a 40% de intensidade. Em seguida, foram centrifugados a 11000 g por 20 minutos a 4 °C e os sobrenadantes foram denominados como sobrenadantes de primeira lavagem e guardados em freezer -20 °C. O pellet resultante foi incubado com tampão de ligação Dynabeads (fosfato de

sódio 50 mM pH 7,8, NaCl 300 mM, 8 M de ureia e 0,01% de Tween® 20) com agitação por inversão *overnight* a 4 °C, em seguida centrifugou-se a 11000 g por 20 minutos e guardou-se o sobrenadante em freezer -20 °C esses foram denominados como sobrenadantes de segunda lavagem.

3.6 Purificação Proteica

Para a purificação da proteína expressa foi utilizado AKTA purifier. Este aparelho é formado por duas bombas, um leitor de luz ultravioleta, programador – software Unicorn 5.0 e coletor de frações Frac 900 (Amersham Pharmacia Biotech) acoplado com coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL (GE Healthcare) de 24 ml e a coluna de afinidade HisTrap FF (GE Healthcare) de 5 ml.

Para purificação por afinidade, foi utilizado também o kit Dynabeads His-tag Isolation & Pulldown NOVEX® (Life Technologies do Brasil Ltda, São Paulo, S.P., Brasil).

3.6.1 Dynabeads His-tag Isolation NOVEX®

Para a purificação das proteínas recombinantes por afinidade, usou-se o sistema cromatográfico de *beads* magnéticas acopladas a cobalto, kit Dynabeads His-tag, de acordo com os dados do fabricante. Os sobrenadantes de primeira lavagem foram misturados (1:1) com o tampão de ligação e lavagem Dynabeads (1X fosfato de sódio 50 mM pH 7,8, 2X NaCl 600 mM e 0,02% de Tween® 20). Já os sobrenadantes de segunda lavagem já estavam em tampão de lavagem e ligação. Incubou-se 50 µl da solução de *beads* magnéticas (200 µg) com 1 ml de amostra em microtubo de 2 ml por inversão e sob refrigeração, por 2 horas.

Após esta etapa, as *beads* foram isoladas com o auxílio de uma estante magnética e lavadas sucessivamente. As proteínas de interesse foram eluídas com os respectivos tampões de eluição (imidazol 300 mM, fosfato de sódio 50 mM pH 7,8, NaCl 300 mM e 0,01% de Tween® 20) com e sem 8 M de ureia.

3.6.2 AKTA purifier com coluna HisTrap FF 5 ml

Foi utilizada uma coluna de afinidade HisTrap FF acoplada a um AKTA purifier de acordo com o protocolo do fabricante, para a purificação da proteína expressa.

A amostra de sobrenadante de primeira lavagem foi misturada com tampão de ligação e lavagem 2 X (1:1), em seguida filtrada em membrana de 0,22 µm. A mistura foi injetada manualmente com auxílio de uma seringa no loop do equipamento. A corrida foi realizada com um fluxo de 5 ml / minuto, com uma lavagem inicial de 2 volumes de coluna (CV) no loop em seguida, realizou-se uma lavagem de 8 CV com tampão de ligação e lavagem (fosfato de sódio 50 mM pH 7,8 +0,3 M de cloreto de sódio). A seguir, foi iniciado um gradiente variando entre 0 a 500 mM de imidazol em 5 CV. No final foi realizada uma lavagem com 1 CV com tampão de eluição (fosfato de sódio 50 mM pH 7,8 +0,5 M de cloreto de sódio + 500 mM de Imidazol). A corrida foi coletada em frações pelo Frac900.

O pico eluído durante o gradiente de imidazol foi coletado e feito uma dialise sob refrigeração com 100 vezes o volume H₂O *MilliQ* por 12 horas, em seguida trocou-se a água incubando por mais 12 horas.

3.6.3 AKTA purifier com coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL

Cromatografia por gel filtração na coluna Superdex™75 10/300GL, foi realizado com o sobrenadante de primeira lavagem e com o material após purificação por Dynabeads histag (em tampão de eluição). Usando nas corridas respectivamente 100 e 500 µl de amostra filtrada em membrana de 0,22 µm, com um fluxo de 0,3 ml/minuto e 0,5 ml/minuto em uma lavagem de 1,5 colunas (36 ml) com fosfato de sódio 20 mM. Foram coletadas em frações de 1 ml.

3.6.4 Dosagem da quantidade de proteína utilizada nos ensaios de atividade

A concentração de proteína utilizada nos testes de atividade foi realizado pelo método de Bradford (1976), utilizando o kit Thermo Scientific Pierce Coomassie Plus Protein Assay em microplaca de 96 poços. Como padrão foi utilizado a solução do kit de Albumina Sérica de 2 mg/ml, preparando diluições seriadas até 25 µg.

Para a determinação da concentração de proteína, utilizou 10 µl dos padrões da diluição seriada e 10 µl de cada amostra misturado com 300 µl de reagente de Bradford do kit. A mistura foi homogeneizada incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida a leitura foi realizada a 595 nm. Com o resultado dos padrões determinou-se a curva de calibração e o resultado das amostras foram comparadas com a curva para determinação da quantidade de proteína.

3.7 Os procedimentos analíticos de células

3.7.1 Linhagens

Células VERO (rim de macaco verde - *Cercopithecus aethiops*) foram cultivadas a 37 °C e 5% de CO₂ em frascos T (25 cm²) com 5 ml de meio Leibovitz (L-15) suplementado com 10% de soro fetal bovino, ou em microplaca de 96 escavações. Estas células foram utilizadas para ensaios antivirais com os vírus do da Herpes.

Células L929. Células L929 (fibroblasto de camundongo – *Mus musculus*) foram cultivadas a 37 °C em frascos T (25 cm²) contendo 5 ml de meio Leibovitz (L-15) suplementado com 10% de soro fetal bovino ou em microplaca de 96 escavações. Estas células foram utilizadas para ensaios antivirais com o enterovírus EMC (vírus da encefalomiocardite de camundongo)

Células SIRC. Células SIRC (córnea de coelho – *Oryctolagus cuniculus*) foram cultivadas a 37 °C e 5% de CO₂ em frascos T (25 cm²) contendo 5 ml de meio MEM (Meio mínimo essencial) suplementado com 5% de soro fetal bovino ou em microplaca de 6 ou 96 escavações. Estas células foram utilizadas para ensaios antivirais com vírus da Rubéola.

3.7.2 Citotoxicidade

Para garantir nos ensaios de atividade antiviral que o efeito citopático seja somente dos vírus avaliados, foi feita uma avaliação da citotoxicidade do material bruto e após as purificações.

Adicionou-se aos cultivos de células Vero e L929, concentrações de 10, 5, e 2% (v/v) das amostras brutas sonicadas em fosfato de sódio 50 mM pH 7,8, das amostras purificadas por gel filtração em fosfato de sódio 20 mM pH 7,8, das

amostras purificadas por afinidade no tampão de eluição (Imidazol 300 mM, fosfato de sódio 50 mM pH 7,8, NaCl 300 mM e 0,01% de Tween® 20), das amostras purificadas com afinidade e em seguida purificada por gel filtração e das amostras purificadas por afinidade HisTrap FF e dialisadas.

A morfologia do cultivo foi observada diariamente em microscópio óptico invertido em aumento de 100 x e 200 x, fotografado, determinando as alterações morfológicas ocorridas nas células.

3.7.3 Determinação do título viral

Amostras dos cultivos infectados foram obtidas diariamente e a quantidade de vírus produzido pelas células foi determinada. Os títulos foram calculados pela metodologia da diluição final, onde as amostras de vírus, em diluições seriadas na razão 2, 5 ou 10, foram tituladas em microplacas de 96 poços, contendo o tipo celular específico para cada vírus (2×10^5 células/ml). As placas foram incubadas a 37 °C e o efeito citopático viral foi observado diariamente. O título das partículas virais infecciosas foi calculado determinando-se a maior diluição viral capaz de causar efeito citopático em 50% do tapete celular (TCID₅₀) (REED; MUENCH, 1938). O título viral é determinado pelo inverso da titulação a partir da presença de efeito citopático, em pelo menos 50% das células da cavidade da microplaca.

3.8 Efeito da proteína recombinante na replicação viral

As proteínas recombinantes brutas (item 3.5) e purificadas (item 3.6) foram testadas em cultivos de células, avaliando a redução do título viral.

3.8.1 Titulação viral em cultivo de células

Para este estudo, cultivos células L929 em microplacas de 96 cavidades com de 2×10^5 células/ml, foram tratadas previamente (1 hora) com 2% (v/v) de proteínas recombinantes (AVLOEc-N-C-His e AVLOEc-N-His) e tampão de eluição.

Após 1 hora de contato, as células foram infectadas com vírus EMC em diluições seriadas em razão 3 (Figura 11). O efeito citopático das células infectadas foi determinado em microscópio após 72 horas, determinou-se a maior diluição do vírus neutralizada pela proteína.

Figura 11 - Esquema de diluição viral do Vírus EMC em 12 poços em razão 3.

Poço	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Diluição	$5,314 \times 10^5$	$1,771 \times 10^5$	$5,905 \times 10^4$	$1,968 \times 10^4$	$6,561 \times 10^3$	$2,187 \times 10^3$	$7,29 \times 10^2$	$2,43 \times 10^2$	81	27	3	1

Legenda: Título inicial do Vírus EMC $5,314 \times 10^5$. Fonte: Giovanni, DNS 2014.

3.8.2 Avaliação da replicação viral por PCR em tempo Real quantitativa

3.8.2.1 Rubéola

O RNA total foi extraído a partir de 200 μ l de cada tipo de cultura infectadas e não infectadas com o Magna Pure extractor (Roche), seguindo o protocolo do fabricante.

Para o vírus da rubéola, RT-PCR foi realizada utilizando a Superscript III RT-PCR (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante, para amplificar um fragmento de 185 nucleotídeos na região de codificação E1 (8807-8991pb) descritos por ABERNATHY et al. (2009). A reação foi realizada em triplicata com volume final de 25 μ l, contendo tampão de reação (Invitrogen), 0,5 μ l de enzima Superscript-*Taq*, 0,2 μ M de cada iniciador, 0,1 μ M de sondas marcadas (Invitrogen) e 100 μ g de RNA. Este ensaio foi realizado em triplicata para cada amostra, incluindo o controle negativo de infecção. Utilizou-se o termociclador em tempo real Applied Biosystems 7500 com o programa 50 °C por 10 minutos, 95 °C por 2 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Como controle endógeno para assegurar a qualidade do RNA, foi utilizado o para de iniciadores RNaseP RNA 15 (EMERY et al., 2004). Quatro controles positivos com números de cópias conhecidos foram utilizados como padrões de quantificação. E três reações utilizando água como controle de negativo de reação. Os dados foram analisados com o software SDS (version 2.1 Applied Biosystems).

3.8.2.2 *Herpes*

Os sobrenadantes coletados e os tapetes celulares oriundos dos testes em placa foram processados usando o kit de extração QIAamp DNA mini kit (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante.

No PCR em tempo real quantitativo para Herpes todo o procedimento foi realizado utilizando a Superscript III RT-PCR Invitrogen, de acordo com as recomendações do fabricante, para amplificar um fragmento de 166 nucleotídeos do gene US4 descrito por Watzinger et al. (2004). A reação foi realizada no volume de 25 μ L, contendo tampão de reação Invitrogen, 0,5 μ l de enzima Superscript-*Taq*, 0,2 μ M de cada iniciador, 0,2 μ M de sondas marcadas Invitrogen e 6 μ l de DNA. Este ensaio foi realizado em triplicata para cada amostra, incluindo o controle negativo de infecção. Foi utilizado o termociclador em tempo real Applied Biosystems 7500 com o programa 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos e 50 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Quatro controles positivos com números de cópias conhecidos foram utilizados como padrões de quantificação.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção da sequência de interesse

4.1.1 Desenho e Análise da sequência da proteína de interesse

De acordo com a sequência da proteína clonada em sistema baculovírus/célula de inseto (CARMO et al., 2012), foi simulada a expressão da construção *AVLOEc-N-C-His* / pET28a, gerando uma proteína com 226 aminoácidos (ANEXO B) e peso molecular de aproximadamente 24615,88 Da, contendo uma cauda de histidina N-terminal com sítio de trombina e outra C-terminal com sítio TEV. Sendo ambos os sítios para remoção das caudas de histina (Figura 12).

Figura 12 - Sequencia teórica de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a.

Sequência [†]	AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCTCTAGAAATAATTTTGTCTTAAGTAAAGGAGATATACCATGGCAGCAGCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGGATCCATGTTGAAGTTTATAATTCGTGTCATTGCTGTGTGCAGTTGCTCAGGCGAAAGAAAATGAATTAATTGGATCAGGTCATCTCATAGCTACGTTTCCGCGTCTTCAAAAACATCTCGTAGCATGTAGTGCCTTTCTCTATACAAAGTCAAAGGAGTCCAATGCACCTGTGGGATGATAAAACCGATGTGCCTTTGCTTGTAAATCAAATACCAATCACCGGACAAACCGCAATCGAGCGACTCTGCCCAAGAATTCATGGCAAGTGAATGGTTAAACTTACGAAGAAGTAAAGGAAACGGTGAATATCAAAACATGCAAATGTGGTAAAGATGAAACGGAATACGAGTATTCTGTCTACAGAGAAATAATGATAATTTTCGGCATTATTTACTCTGCACCGCAGTCTCCAAACGGACCTGAAATCGCATTATCTCCGTGGAACTTTACCTACAAAGACTGTTTTTCGAGAATACGATTAAAGTATACCGGAATTGCAAGTAGATCCGACTACGAGCTGTTATGCGATTTGAGTTGAAACCTGTATTTTCAGGGCATCACCATCACCATCATTAAAGCTTCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAACCGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG
Tradução 5'3' Frame 1	MetGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSMKFIILSLLCAVAQAEENELIGSGHLIATFPRLLQKHLVACSAFSLYKVKGVQCTCGDKTDVPLLVIKYQSPVKPQSSDSAQEFMASVMVKTYEEVKETVNIKTCKGKDETEYEYSVYREINDNFGIIYSAPQSPNGPEIAFISVETLPTKTVFENTIKSIPELASRSDYELLCDLSENLYFQGHHHHHStopKL
Primer sense	5' - GAGGGATCCATGTTGAAGTTTATAATTC - 3'
Primer Anti-sense	5' - GAGAAAGCTTTTAACTGATGGTGATGGTGATGGCCCTGAAAATACAGGTTTTCCTCAATCGCATAACAG - 3'

Legenda: Codon de Partida, Sítio de Trombina, Cauda de Histidina, Sítio BamHI, Sítio TEV, Códon de Parada e Sítio de HindIII e Iniciadores T7 Promoter e T7 terminator respectivamente (amplificado 876 pb). Fonte: Giovanni, DNS 2013

[†]Número de acesso GenBank Proteína Antiviral(JN807330)

Foi simulada também a expressão da construção *AVLOEc-N-His* / pET28a, gerando uma proteína com 219 aminoácidos (ANEXO B) e peso molecular de aproximadamente 24171,36 Da, contendo uma cauda de histidina N-terminal com sítio TEV (Figura 13).

Figura 13 - Sequência teórica de *AVLOEc-N-His* /pET28a.

Sequência [‡]	AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAAAC AATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGC AGC CATCATCATCATCATCAGCAGCGGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCATATGGCTA GCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAAAACCTGTACTTCCAGGGCAT GTTGAAGTTTATAATTCGTGCATTACTGTGCGCAGTTGCTCAGGCGGAAGAAAATGAA TTAATTGGATCAGGTCATCTCATAGCTACGTTTCCGCGTCTTCAAAAACATCTCGTAG CATGTAGTGCGTTTTCTCTATACAAAGTCAAAGGAGTACAATGCACCTGTGGCGATAA AACCGATGTGCCTTTGCTTGTAATCAAATACCAATCACCGGTCAAACCGCAATCGAGC GACTCTGCCCCAAGAATTCATGGCAAGTGTAATGGTTAAACTTACGAAGAAGTAAAGG AAACGGTGAATATCAAACATGCAAATGTGGTAAAGATGAAACGGAATACGAGTATTC TGCTCTACAGAGAAATAAATGATAATTCGGCATTATTTACTCTGCACCGCAGTCTCCA AACGGACCTGAAATCGCATTTATCTCCGTGGAACCTTGCTACAAAGACTGTTTTTCG AGAATACGATTAAAAGTATACCGGAATTGGCAAGTAGATCCGACTACGAGCTGTTATG CGATTTGAGTTAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCC GGCTGCTAACAAGCCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAA CTAGCATAACCCCTTGCGGCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG
Tradução 5'3' Frame 1	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQMGRGSENLYFQGMKFIILSLCAVAQAEENELIG SGHLIATFRLQKHLVACSAFSLYKVKGVQCTCGDKTDVPLLVIKYQSPVKPQSSDSAQEFMAS VMVKTYEEVKETVNIKTCKGKDETEYEYSVYREINDNFGIYSAPQSPNGPEIAFISVETLPT KTVFENTIKSIPELASRSDYELLCDLSStop
Primersenso	5' - GAGGATCCGAAAACCTGTACTTCCAGGGCATGTTGAAGTTTATAATTC - 3'
PrimerAnti- senso	5' - GAGAAGCTTAACTCAAATCGCATAACAG - 3'

Legenda: **Códon de Partida**, **Sítio de Trombina**, **Cauda de Histidina**, **Sítio BamHI**, **Sítio TEV**, **Códon de Parada**, **Sítio de HindIII** e **Iniciadores T7 Promoter e T7 terminator respectivamente (amplificado 855pb)**. Fonte: Giovanni, DNS 2013

4.1.2 Frequência de Códon

A análise de códon da proteína antiviral realizada pelo Software: *Graphical Códon Usage Analyser*, demonstrou que, ao utilizarmos a linhagem *E. coli* como hospedeira, foi encontrado um códon de baixa frequência (Figura 14 em amarelo e ANEXO A).

Segundo os parâmetros do software; barras em verde, indicam códon com frequência maior que 20%; barras em amarelo, indicam códon com baixa frequência entre 10 e 20%; barras em vermelho, não representado no gráfico,

[‡]Número de acesso GenBank Proteína Antiviral(JN807330)

seriam de códons raros com frequência abaixo de 10%, tendendo a reduzir muito os níveis de expressão (FUHRMANN et al., 2004).

Figura 14 - Tabela de frequência de códons de *E. coli* presentes na sequência de AVLOEc

Legenda: Gráfico de frequência de códons: em verde, códons com frequência maior que 20%; em amarelo, códon 46 com frequência entre 10 e 20%; em vermelho, códon com frequência abaixo de 10% (Não houve). Fonte: Giovanni DNS 2014.

4.1.3 Amplificação da sequência da proteína de interesse

Com os dois pares de iniciadores descritos (Tabela 2) foi realizado 3 reações de PCR para cada par de iniciadores, uma sendo controle negativo e duas utilizando pFastBac1-AVLO como molde. A amplificação do inserto AVLOEc-N-C-His gerou uma banda de 594 pb (Figura 15). A amplificação do inserto AVLOEc-N-His gerou uma banda de 575 pb (Figura 16). As amostras foram visualizadas em gel de agarose 2% contendo GelRed™ da Biotium em cuba horizontal e foto documentado utilizando equipamento Biometra e software BioDocAnalysis.

Figura 15 - Gel de agarose 2% para visualização PCR para obtenção de inserto AVLOEc-N-C-His.

Legenda: 1 - marcador de pares de base 1 kb Ladder (Invitrogen), 2 – Controle Negativo e 3 e 4 - amplificação do inserto AVLOEc-N-C-His (594 pb). Fonte: Giovanni 2012.

Figura 16 - Gel de agarose 2% para visualização PCR para obtenção de inserto AVLOEc-N-His.

Legenda: 1 - marcador de pares de base 1 kb Ladder (Invitrogen), 2 – Controle Negativo e 3 e 4 - amplificação do inserto AVLOEc-N-His (575 pb). Fonte: Giovanni, DNS 2013.

4.1.4 Digestão dos insertos e do vetor pET28a

Nas amostras de vetor pET28a e dos insertos AVLOEc-N-C-His (Figura 17) e AVLOEc-N-His (imagem não mostrada) foi feita digestão dupla das com as enzimas HindIII e BamHI.

Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose (1%) digestão enzimática pET28a e inserto AVLOEc-N-C-His

Legenda: 1 - marcador de peso molecular 1Kb Ladder (Biolabs); 2 e 4 – Vetor pET28a fechado apresentado as 3 isoformas; 3 e 5 - vetor pET28a vazio digerido com enzimas de restrição HindIII e BamHI; 6- Vazio; 7,8 e 9 - Inserto AVLOEc digerido com HindIII e BamHI. Fonte: Giovanni, 2013.

4.1.5 Purificação dos insertos e vetor por extração do gel de agarose

Após as digestões, foi feita a purificação das bandas do vetor e dos insertos com o kit MinElute® Gel Extraction (QIAGEN®), seguindo especificações do fabricante (APÊNDICE C). Para isso, do gel acima (Figura 17), recortou-se as bandas digeridas dos poços 3 e 5 referente ao vetor pET28a de 5469 pb e as dos poços 7 a 9 correspondentes ao inserto AVLOEc-N-C-His de 594 pb. De outro gel foi recortado também as bandas do inserto AVLOEc-N-His de 575 pb (imagem não mostrada).

4.1.6 Ligaço dos insertos no vetor pET28a

O vetor e os insertos previamente digeridos, purificados e quantificados pelo espectrofotmetro NanoDrop® ND-1000 foram adicionados na reao em proporo 3:1 (inserto:vetor) seguindo a equao descrita no tpico 3.2.5. Segundo a equao,

para cada 50 ng de vetor foi utilizado 15,50 ng de inserto. Para reação de 20 µl foi necessário 6 µl de vetor (8,5 ng/µl) + 1 µl de inserto (16 ng/µl). Foi montada 2 reações de ligação para cada inserto.

4.1.7 Transformação das construções em *E. coli* TOP 10

Os quatro produtos das reações de ligação (4.1.5) e vetor pET28a vazio (controle de transformação) foram transformados em bactéria *E. coli* TOP 10 quimiocompetente (ANEXO D). Foram obtidas cerca de 50 colônias brancas por placa. Já na placa de controle, apenas colônias azuis foram obtidas conforme o esperado.

4.1.8 Análises dos transformantes *E. coli* TOP10

4.1.8.1 Triagem por PCR

Para confirmação dos clones transformantes em *E. coli* TOP 10, foi feita PCR com iniciadores T7 (Figura 7) das colônias crescidas em microplaca da Figura 9. Nos clones *AVLOEc-N-C-His* / pET28a (Figura 9 poços amarelos) esperava-se uma amplificação com tamanho referente a inserto + vetor de 876 pb (Figura 12). Nos clones *AVLOEc-N-His* / pET28a (Figura 9 poços verdes) esperava-se uma amplificação com tamanho referente a inserto + vetor de 855 pb (Figura 13).

Os resultados da PCR foram condizentes com o esperado (Tabela 3), dos quarenta clones amplificados de *AVLOEc-N-His* / pET28a, 32 apresentaram tamanho de banda esperado e apenas 8 não apresentaram amplificação. Já para os 37 clones de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a, 31 apresentaram tamanho de banda esperado, 4 não amplificaram e 2 apresentou tamanho de banda condizente com vetor vazio. Os 11 controles negativos de cultivo não apresentam amplificação. Na Figura 18 visualiza-se padrão de amplificação encontrado, sendo: 1 o controle negativo não apresentou banda, 2 o controle positivo apresentou banda conforme o esperado de aproximadamente 318 pb, 3 os clones positivos de *AVLOEc-N-His* / pET28a com amplificação referente a inserto + vetor 855 pb, 4 os controles negativos de cultivo não apresentam amplificação, 5 e 7 os clones positivos de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a com amplificação referente a inserto + vetor 876 pb e 6

os clones negativos de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a com amplificação referente ao vetor vazio 318 pb.

Tabela 3 - Resultado quantitativo da PCR de triagem dos clones em *E. coli* TOP 10

	Total analisado	Resultado Esperado	Resultado não esperado
Controle Negativo	2	2 (Sem amplificação)	0
Controle positivo	2	2 (Banda de 318pb)	0
Controle negativo de cultivo	11	11 (Sem amplificação)	0
<i>AVLOEc-N-C-His</i> /pET28a	37	31 (Banda de 876pb)	6 (4, sem amplificação; 2, banda de 318pb)
<i>AVLOEc-N-His</i> /pET28a	40	32 (Banda de 876pb)	8 (Sem amplificação)

Fonte: Giovanni, DNS 2014.

Figura 18 - Gel de agarose 1,5% para visualização da PCR de triagem dos clones dos transformantes *E. coli* TOP10.

Legenda: 1 – Controle negativo; 2 - Vetor pET28a vazio, amplificação de 318 pb; 3 - Clone positivo de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a, amplificação com tamanho referente a inserto + vetor de 855 pb, 5 e 7 - Clones positivos de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a, amplificação com tamanho referente a inserto + vetor de 876 pb; 4 – Controle negativo de cultivo; 6 – Clone negativo amplificação com tamanho referente a vetor sem inserto 318 pb; 8 - Marcador 1kb (Fermentas). Fonte: Giovanni, DNS 2014.

4.1.9 Sequenciamento

Os clones foram analisados quanto à ausência de mutações que possam ter sido originadas nas PCRs, bem como quanto à correta inserção dos insertos no vetor pET28a pelo sequenciamento nucleotídico utilizando o kit BigDye™ pelo método do dideoxinucleotídeo, utilizando os iniciadores T7 (Figura 7).

Os resultados do sequenciamento foram coerentes com o obtido na PCR (4.1.8.1) confirmando a recombinação entre insertos e vetores, exceto uma construção de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a que não apresentava inserto. A Figura 19, mostra o resultado do sequenciamento dos dois clones positivos de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a.

Figura 19 - Resultado obtido do sequenciamento dos clones *AVLOEc-N-C-His* / pET28a e provável tradução da proteína expressa.

Sequência clones <i>AVLOEc-N-C-His</i> / pET28a	<p>ATGGGCAGCAGC CATCATCATCATCATCAGCAGCGGC CTGGTGCCGCGCGGCAGC CA</p> <p>TATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTTCGCGGATCCATGTTGAAGTTTATAA</p> <p>TTCTGTGTCATTGCTGTGTGCAGTTGCTCAGGCGAAAGAAAATGAATTAATTGGATCAGGT</p> <p>CATCTCATAGCTACGTTTCCGCGTCTTCAAAAACATCTCGTAGCATGTAGTGCCTTTTC</p> <p>TCTATACAAAGTCAAAGGAGTCCAATGCACCTGTGGCGATAAAACCGATGTGCCTTTGC</p> <p>TTGTAATCAAATACCAATCACCGGACAAACCGCAATCGAGCGACTCTGCCCAAGAATTC</p> <p>ATGGCAAGTGTAATGGTTAAACTTACGAAGAAGTAAAGGAAACGGTGAATATCAAAAC</p> <p>ATGCAAATGTGGTAAAGATGAAACGGAATACGAGTATTCTGTCTACAGAGAAATAAATG</p> <p>ATAATTTTCGGCATTATTTACTCTGCACCGCAGTCTCCAAACGGACCTGAAATCGCATTT</p> <p>ATCTCCGTGGAAACTTTACCTACAAAGACTGTTTTTCGAGAATACGATTAAAAGTATACC</p> <p>GGAATTGGCAAGTAGATCCGACTACGAGCTGTTATGCGATTTGAGTAAAAACCTGTATT</p> <p>TTAGGGC CATCACCATCACCATCTAAGCTT GCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCA</p> <p>CCACCACTGAGATCCGGC</p>
Tradução	<p>MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSM LKFII LSLCAVAQAKENELIGSG</p> <p>HLIATFPRLQKHLVACSAFSLYKVKG VQCTCGDKTDVPLLVIKYQSPDKPQSSDSAQEF</p> <p>MASVMVKTYEEVKETVNIKTCKGKDETEYEYSVYREINDNFGIIYSAPQSPNGPEIAF</p> <p>ISVETLPTKTVFENTIKSIPELASRS DYELLCDLSENLYFQGH HHHH*</p>

Legenda: Codon de Partida, Sítio de Trombina, Cauda de Histidina, Sítio BamHI, Sítio TEV, Códon de Parada e Sítio de HindIII. Fonte: Giovanni, DNS. 2012

A Figura 20, mostra o resultado do sequenciamento dos 3 clones positivos de *AVLOEc-N-His* / pET28a.

Figura 20 - Resultado obtido do sequenciamento do clone *AVLOEc-N-His* / pET28a e provável tradução da proteína expressa.

Sequencia clones <i>AVLOEc-N-His</i> /pET28a	<p>ATGGGCAGCAGC CATCATCATCATCATCAGCAGCGGC CTGGTGCCGCGCGG</p> <p>CAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGC GGATCCGAAACCTGT</p> <p>ACTTCCAGGGCATGTTGAAGTTTATAATTCTGTCATTACTGTGCGCAGTTGCTCAGGCG</p> <p>GAAGAAAATGAATTAATTGGATCAGGTCATCTCATAGCTACGTTTCCGCGTCTTCAAAA</p> <p>ACATCTCGTAGCATGTAGTGC GTTTTCTCTATACAAAGTCAAAGGAGTACAATGCACCT</p> <p>GTGGCGATAAAACCGATGTGCCTTTTGCTTGTAATCAAATACCAATCACCGGTCAAACCG</p> <p>CAATCGAGCGACTCTGCCCAAGAATTCATGGCAAGTGAATGGTTAAAACTTACGAAGA</p> <p>AGTAAAGGAAACGGTGAATATCAAAACATGCAAAATGTGGTAAAGATGAAACGGAATACG</p> <p>AGTATTCTGTCTACAGAGAAATAAATGATAATTTCCGGCATTATTTACTCTGCACCGCAG</p> <p>TCTCCAAACGGACCTGAAATCGCATTTATCTCCGTGGAAACCTTGCTACAAAGACTGT</p> <p>TTTCGAGAATACGATTAAGTATACCGGAATTGGCAAGTAGATCCGACTACGAGCTGT</p> <p>TATGCGATTTGAGTTAGCTT GCGGCCGCACTCGA</p>
Tradução	<p>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSENYFQGMKFIIISLLCAVAQAEE</p> <p>NELIGSGHLIATFPRQLQHLVACSAFSLYKVKGVQCTCGDKTDVPLLVIKYQSPVKPQSSDSAQE</p> <p>FMASVMVKTYEEVKETVNIKTCKCGKDETEYEYSVYREINDNFGIIYSAPQSPNGPEIAFISVET</p> <p>LPTKTVFENTIKSIPELASRSDYELLCDLS*</p>

Legenda: Codon de Partida, Sítio de Trombina, Cauda de Histidina, Sítio BamHI, Sítio TEV, Códon de Parada e Sítio de HindIII, Mutação silenciosa. Fonte: Giovanni, DNS 2012.

4.2 Transformação em Cepa de Expressão *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

Para a transformação foi usada duas amostras de *AVLOEc-N-His* / pET28a e duas amostras de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a, todas confirmadas por sequenciamento e vetor pET28a vazio (controle de transformação). Todos eles foram transformados em bactéria *E. coli* BL21 (DE3) pLysS quimiocompetente segundo protocolo (ANEXO D) e obtidas mais de 200 colônias por placa.

4.2.1 Análises dos transformantes *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

4.2.1.1 Triagem por PCR

Para confirmação dos clones transformantes em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, foi feita PCR com iniciadores T7 (Figura 7) das colônias crescidas em microplaca (Figura 10).

Os clones *AVLOEc-N-C-His* / pET28a (Figura 10 poços amarelos) esperava-se uma amplificação com tamanho referente a inserto + vetor de 876 pb (Figura 12). Nos clones *AVLOEc-N-His* / pET28a (Figura 10 poços verdes) esperava-se uma amplificação com tamanho referente a inserto + vetor de 855 pb (Figura 13).

Os resultados da PCR foram condizentes com os resultados esperados (Tabela 4), dos 28 clones amplificados de *AVLOEc-N-His* / pET28a, todos

apresentaram tamanho de banda esperado. Já para os 28 clones de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a 18 apresentaram tamanho de banda esperado e 10 não amplificaram. Os 8 controles negativos de cultivo e os controles negativos de reação não apresentaram amplificação, já os controles positivos de reação apresentam amplificação. Figura 21 visualiza-se padrão de amplificação encontrado, sendo: 1 Marcador 1kb (Fermentas) 2 e 3 clones positivos de *AVLOEc-N-His* / pET28a com amplificação referente a inserto + vetor 855 pb, 4 e 5 clones positivos de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a com amplificação referente a inserto + vetor 876 pb e 6 o controle negativo de cultivo.

Tabela 4 - Resultado quantitativo da PCR de triagem dos clones em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

	Total analisado	Resultado Esperado	Resultado não esperado
Controle Negativo	2	2 (Sem amplificação)	0
Controle positivo	2	2 (Banda de 318pb)	0
Controle negativo de cultivo	8	8 (Sem amplificação)	0
<i>AVLOEc-N-C-His</i> /pET28a	28	18 (Banda de 876pb)	10 (sem amplificação)
<i>AVLOEc-N-His</i> /pET28a	28	28 (Banda de 876pb)	0

Fonte: Giovanni, DNS 2014.

Figura 21 - Gel de agarose 1,5% para visualização da PCR de triagem dos clones dos transformantes em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.

Legenda: 1 – Marcador 1kb (Fermentas) 2 e 3 - Clones positivos de *AVLOEc-N-His* /pET28a, amplificação com tamanho referente a inserto + vetor de 855pb, 4 e 5 - Clones positivos de *AVLOEc-N-C-His* /pET28a, amplificação com tamanho referente a inserto + vetor de 876pb; 6 – Controle negativo de cultivo. Controles de reação negativo e positivo não foram mostrados. Fonte: Giovanni, DNS 2014.

4.3 Indução da expressão proteica

Como protocolo de indução inicial optou-se por trabalhar nas condições mais usuais de indução 37 °C, 250 rpm e 1 mM de IPTG por 4 horas (MAZZUCHELLI-DE-SOUZA et al., 2013; NOVAGEN, 2005). Foi feita a indução com dois clones de *AVLOEc-N-His* / pET28a e dois clones de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a.

Durante a indução separou-se duas alíquotas de 2 ml em cada condição não induzida (tempo 0) e induzida (tempo 4 horas) de cada clone, centrifugou a 10000 g por 5 minutos e ressuspendeu o pellet em 200 µl de fosfato de sódio 50 mM pH 7,8.

4.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Para avaliar a indução de expressão proteica, 20 µl das amostras do item 0 foram misturadas com 10 µl de tampão de amostra para lise, ferveu-se por 5 minutos em seguida aplicou em um gel de poliacrilamida 15% SDS. Os poços: 2 e 4 são de extrato bacteriano lisado em tampão de amostra após 4 horas de indução dos clones de *AVLOEc-N-His* / pET28a; em 3 e 5 são de extrato bacteriano lisado em tampão de amostra sem indução dos clones de *AVLOEc-N-His* / pET28a; em 6 e 8 são de extrato bacteriano lisado em tampão de amostra após 4 horas de indução dos clones de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a; os poços 7 e 9 são de extrato bacteriano lisado em tampão de amostra sem indução dos clones de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a.

Na Figura 22 é possível visualizar o aparecimento de uma banda próxima de 25 kDa (setas) após 4hs de indução.

Figura 22 - Gel de poliacrilamida 15% de amostras no tempo 0 e 4 horas de indução em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.

Legenda: - Gel de poliacrilamida 15%; 1 - Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, 2 - Clone 1 AVLOEc-N-His /pET28a após 4 horas de indução; 3 - Clone 1 AVLOEc-N-His /pET28a tempo zero de indução; 4 - Clone 2 AVLOEc-N-His /pET28a após 4 horas de indução; 5 - Clone 2 AVLOEc-N-His /pET28a tempo zero de indução; 6 - Clone 1 AVLOEc-N- C-His /pET28a após 4 horas de indução; 7 - Clone 1 AVLOEc-N- C-His /pET28a tempo zero de indução; 8 - Clone 2 AVLOEc-N- C-His /pET28a após 4 horas de indução; 9 - Clone 2 AVLOEc-N-C-His /pET28a tempo zero de indução. Setas vermelhas proteína recombinante expressa AVLOEc-N-His, Setas rosas proteína recombinante expressa AVLOEc-N-C-His. Fonte: Giovanni, DNS 2014.

4.3.2 Avaliação de perfil cromatográfico pelo AKTA purifier (Amersham Pharmacia Biotech) com coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL

Para obtenção do perfil cromatográfico dos cultivos bacterianos induzidos e não induzidos, as mesmas amostras aplicadas no gel de poliacrilamida da Figura 22 foram aplicadas no AKTA purifier com coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL. Esta coluna apresenta uma faixa de resolução ótima entre 3 kDa e 70 kDa, sendo assim excelente para visualizar as proteínas em induzidas de aproximadamente 24,5 kDa.

Executou-se diversas corridas utilizando 100 µl da amostra ressuspendidas em fosfato de sódio 50 mM pH 7,8 conforme o item 0. A amostra era aquecida a 100 °C por 5 minutos para lise bacteriana e centrifugada por 3 minutos a 11000 g, o sobrenadante era aplicado com auxílio de uma seringa no equipamento.

Os resultados dos perfis cromatográficos usando a coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL em fluxo de 0,5 ml/minuto e volume de corrida de 1,5

colunas (36 ml) são apresentados abaixo. Na Figura 23 é apresentado o perfil cromatográfico da amostra não induzida de *AVLOEc-N-His* / pET28a, na Figura 24 é apresentado o perfil cromatográfico da amostra não induzida de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a. Na Figura 25 é apresentado o perfil cromatográfico da amostra induzida de *AVLOEc-N-His* / pET28a e na Figura 26 é apresentado o perfil cromatográfico da amostra induzida de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a

Figura 23 - Cromatograma de gel filtração de amostra não induzida de *AVLOEc-N-His* / pET28a.

Legenda: Cromatografia em coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL da amostra não induzida de *AVLOEc-N-His* /pET28a, A corrida foi realizada com um fluxo de 0,5 ml/minuto em uma lavagem de 1,5 colunas (36 ml) com fosfato de sódio 20 mM. Fonte: Giovanni, DNS 2014.

Figura 24 - Cromatograma de gel filtração de amostra não induzida de *AVLOEc-N-C-His* / pET28a

Legenda: Cromatografia em coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL da amostra não induzida de *AVLOEc-N-C-His* /pET28a, A corrida foi realizada com um fluxo de 0,5 ml/minuto em uma lavagem de 1,5 colunas (36 ml) com fosfato de sódio 20 mM. Fonte: Giovanni, DNS 2014.

Figura 25 - Cromatograma de gel filtração de amostra induzida de AVLOEc-N-His / pET28a.

Legenda: Cromatografia em coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL da amostra induzida com 1 mM de IPTG por 4 horas de AVLOEc-N-His His /pET28a, A corrida foi realizada com um fluxo de 0,5 ml/minuto em uma lavagem de 1,5 colunas (36 ml) com fosfato de sódio 20 mM. Fonte: Giovanni, DNS 2014.

Figura 26 - Cromatograma de gel filtração de amostra induzida de AVLOEc-N-C-His / pET28a.

Legenda: Cromatografia em coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL da amostra induzida com 1 mM de IPTG por 4 horas de AVLOEc-N-His His /pET28a. A corrida foi realizada com um fluxo de 0,5 ml por minuto em uma lavagem de 1,5 colunas (36 ml) com fosfato de sódio 20 mM. Fonte: Giovanni, DNS 2014.

Os perfis cromatográficos obtidos do sobrenadante de cultivo de bactérias induzidos e não induzidos foram reprodutíveis (item 0). Fazendo a sobreposição de 6 cromatogramas de absorbância em 280 nm das alíquotas sem indução (linhas marrom, azul claro e laranja) e induzidas (linhas azul escuro, vermelho e verde), foi

possível visualizar nas amostras induzidas um pico presente entre as proteínas de baixo peso molecular (seta vermelha) correspondente a proteína desejada.

Figura 27 - Sobreposição de cromatogramas de gel filtração de amostras induzidas e não induzidas.

Legenda: Sobreposição dos perfis cromatográficos das amostras induzidas (linhas azul escuro, vermelho e verde) e das amostras sem indução (linhas marrom, azul claro e laranja). Seta vermelha, pico presente entre as proteínas de baixo peso molecular somente nas amostras induzidas. Fonte: Giovanni, DNS, 2014.

4.3.3 Western Blot

O resultado obtido do western blot, realizado com anticorpo anti-his, foi possível detectar a presença da proteína recombinante (Figura 28).

Figura 28 - Western Blot extrato bruto bacteriano do clone *AVLOEc-N-C-His / pET28a*.

Legenda: Western Blot do extrato bruto bacteriano. 1 - Marcador de peso Molecular; 2 e 4 - Extrato bruto clone *AVLOEc-N-C-His/ pET28a* induzido; 3 - Extrato bruto clone *AVLOEc-N-C-His /pET28a* não induzido. Fonte: Giovanni, DNS, 2014.

4.4 Purificação Proteica

Após a lise pelo sonicador os sobrenadantes de primeira lavagem em Fosfato de Sódio 50 mM pH 8,0 e os sobrenadantes de segunda lavagem em tampão de ligação Dynabeads (fosfato de sódio 50 mM pH 7,8, NaCl 300 mM, 8 M de ureia e 0,01% de Tween® 20) foram purificados inicialmente por afinidade no sistema Dynabeads, descrito abaixo.

4.4.1 Dynabeads His-tag Isolation & Pulldown (NOVEX® - life technologies™)

A purificação das proteínas recombinantes por afinidade usando o sistema Dynabeads Histag foi eficiente em ambas as construções *AVLOEc-N-His* (Figura 29 1 a 4) e *AVLOEc-N-C-His* (Figura 29 A a E). As proteínas purificadas, no poço 2 com 258 µg/ml e no poço B com 132 µg/ml foram derivadas dos sobrenadantes de primeira lavagem (fração solúvel) (poços 1 e C). Dos sobrenadantes de segunda lavagem (poços 3 e D), não foi recuperada proteína em quantidades significativas na purificação (poços 4 e E).

Figura 29 - Gel de poliacrilamida 15% de amostras antes e depois da purificação por Dynabeads.

Legenda: Purificação por afinidade usando dynabeads: M - Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder; *AVLOEc-N-His* /pET28a (1 a 4), 1 - sobrenadante de primeira lavagem (fração solúvel), 2 - purificado por afinidade do sobrenadante de primeira lavagem, 3 - sobrenadante de segunda lavagem (fração insolúvel), 4 - purificado por afinidade do sobrenadante de segunda lavagem; *AVLOEc-N-C-His* /pET28a (A a E), A - amostra de lisado total de bactéria após 4 horas de indução, B - purificado por afinidade do sobrenadante de primeira lavagem, C - sobrenadante de primeira lavagem (fração solúvel), D - sobrenadante de segunda lavagem (fração insolúvel), E - purificado por afinidade do sobrenadante de segunda lavagem. Fonte: Giovanni, DNS 2014.

Com o resultado satisfatório deste método de purificação, foi realizada novas purificações para obtenção de proteína recombinante do sobrenadante de primeira lavagem. Estas foram denominadas como Dyna-AVLOEc-N-His e Dyna-AVLOEc-N-C-His.

4.4.2 AKTA purifier (Amersham Pharmacia Biotech) com coluna HisTrap FF (GE Healthcare) 5ml

As purificações no AKTA purifier com a coluna de afinidade HisTrap FF estão apresentadas na Figura 30, com isso 7,5 ml amostra de AVLOEc-N-C-His (974,43 µg/ml) foi injetada na coluna, totalizando aproximadamente 7308,224 µg de proteína. O material não retido (frações de 1 a 7) na concentração de 271,124 µg/ml, totalizando 4744,667 µg. O pico eluído nas frações 28 e 29 na concentração de 614,93 e 274,06 µg/ml, respectivamente totalizando 2222,49 µg de proteína aderida a coluna.

Figura 30- Cromatografia em coluna de afinidade HisTag FF 7,5 ml *sobrenadante de primeira lavagem* de AVLOEc-N-C-His / pET28a.

Legenda: Corrida com fluxo de 5,0 ml/min de 7,5 ml de extrato bruto resultante da indução do clone AVLOEc-N-C-His /pET28a, em azul Absorbância em 280nm, em vermelho frações coletas. As frações de 1 a 7 material não aderido na coluna, 8 a 21 material eluído durante a lavagem, Frações de 22 a 32 gradiente de 0 a 300 mM de imidazol, 33 e 34 lavagem com tampão de eluição com 300 mM de imidazol e frações 28 e 29 material eluído durante gradiente de imidazol. Fonte: Giovanni, DNS 2014.

Após a purificação em coluna de afinidade na Figura 30, alíquotas das frações da corrida acima foram aplicadas em gel de SDS-PAGE 15%, no poço 1 encontra-se a amostra bruta filtrada, o pool do material não aderido na coluna no poço 2 e o material eluído nas frações 28 e 29 estão nos poços 3 e 4 respectivamente.

Figura 31- Gel SDS-PAGE amostras da purificação HisTrap FF AVLOEc-N-C-His.

Legenda: Gel de SDS-PAGE 15%: M - marcador de peso molecular; 1 - amostra bruta filtrada; 2 - pool do material não aderido na coluna; 3 - material eluído fração 28; 4 - material eluído fração 29. Fonte: Giovanni, DNS 2014.

As amostras resultantes dos picos eluídos no gradiente de imidazol destas corridas de purificação foram denominadas HisTrap-FF-AVLOEc-N-His e HisTrap-FF-AVLOEc-N-C-His após a dialise foram denominados como HisTrap-D-AVLOEc-N-His e HisTrap-D-AVLOEc-N-C-His.

4.4.3 AKTA purifier com coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL

As amostras de sobrenadante de primeira lavagem (item 4.4) e amostras purificadas por dynabeads (item 4.4.1), também foram purificadas em coluna de gel filtração. Para as amostras de sobrenadante de primeira lavagem (Figura 32), foi injetado 500 µl contendo 2,0 mg/ml de proteína, apresentou um pico com bastante acúmulo de material em torno de 20 ml de eluição. A posição de saída é condizente com a Figura 27 seta vermelha, pico presente nas amostras de material induzido. Para análise, foi coletada as frações correspondentes aos volumes de eluição entre 18 e 22 ml, estas foram denominadas como GF-AVLOEc-N-C-His e GF-AVLOEc-N-His.

Foi injetado na coluna, 400 μ l do material purificado por Dynabeads (contendo 232 μ g/ml de proteína), e apresentou um pico simétrico com bastante acúmulo de material em torno de 22 ml de eluição (Figura 33). Foi coletado as frações correspondentes aos volumes de eluição, estas amostras resultantes dessas corridas foram denominadas como Dyna-GF-AVLOEc-N-C-His e Dyna-GF-AVLOEc-N-His para as futuras análises

Figura 32 - Cromatografia em coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL do sobrenadante de primeira lavagem de AVLOEc-N-C-His

Legenda: Cromatografia em coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL do sobrenadante de primeira lavagem de AVLOEc-N-C-His, a corrida foi realizada com um fluxo de 0,3 ml/minuto em uma lavagem de 1,5 colunas (36 ml) com fosfato de sódio 20 mM. Fonte: Giovanni, DNS 2014.

Figura 33 - Cromatografia em coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL da amostra Dyna-AVLOEc-N-C-His.

Legenda: Cromatografia em coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL da amostra Dyna-AVLOEc-N-C-His, a corrida foi realizada com um fluxo de 0,5 ml/minuto em uma lavagem de 1,5 colunas (36 ml) com fosfato de sódio 20 mM. Fonte: Giovanni, DNS 2014.

4.5 Efeito da proteína recombinante na replicação viral

4.5.1 Citotoxicidade

A citotoxicidade das amostras foi avaliada em células Vero e L929, a fim de garantir que o efeito citopático fosse causado pelo vírus.

Nas amostras brutas, o sobrenadante de primeira lavagem AVLOEc-N-His e AVLOEc-N-C-His (item 0), após 24 horas, não foi visível em nenhuma das concentrações o efeito citopático, 200, 100 e 40 µg/ml (Figura 34). Após 72 horas foi observado toxicidade nas concentrações acima de 100 µg/ml em ambas linhagens.

Também não foi observado nenhum efeito citopático em 24 horas nas amostras Dyna-AVLOEc-N-His e Dyna-AVLOEc-N-C-His, nas concentrações de 30 (10), 15 (5) e 6 (2) µg/ml (% v/v) (Figura 35), no entanto as 3 concentrações mostraram sinais de toxicidade em ambas linhagens proporcional a quantidade de amostra, após 72 horas. Entretanto, quando avaliou-se o tampão de eluição puro, usado nas purificações (Figura 36) observou-se um efeito pronunciado após 24 horas em ambas as linhagens celulares a 10% (Figura 36 A e D), com 5% (Figura 36 B e E) foi observado toxicidade nas células em ambas linhagens. Já com 2% (Figura 36 C e F) não apresentou efeito citopático após 24hs de contato. Após 72 horas, as 3 concentrações mostraram-se tóxicas em ambas linhagens.

As amostras purificadas por gel filtração em fosfato de sódio 20 mM pH 7,8 (GF-AVLOEc-N-His e GF-AVLOEc-N-C-His), as amostras purificadas com afinidade e em seguida purificada por gel filtração (Dyna-GF-AVLOEc-N-His e Dyna-GF-AVLOEc-N-C-His) e das amostras purificadas por afinidade HisTrap FF e dialisadas (Dyna-GF-AVLOEc-N-C-His e Dyna-GF-AVLOEc-N-His) não apresentaram efeitos citopáticos em nenhuma das concentrações utilizadas.

Figura 34 - Efeito citopático do sobrenadante de primeira lavagem em células Vero e L929

Legenda: Efeito citopático após 24 horas do sobrenadante de primeira lavagem à 200, 100 e 40 µg/ml em células Vero (A, B e C) em células L929 (D, E e F). Fonte: Giovanni, DNS 2014.

Figura 35 - Efeito Citopático de Dyna-AVLOEc-N-His em células Vero e L929.

Legenda: Efeito citopático após 24 horas do material purificado por afinidade Dyna-AVLOEc-N-His à 30, 15 e 6 µg/ml em células Vero (A, B e C) em células L929 (D, E e F). Fonte: Giovanni, DNS 2014.

O Efeito Citopático de Dyna-AVLOEc-N-His e Dyna-AVLOEc-N-C-His foram idênticos em células Vero e L929.

Figura 36 - Efeito Citopático do tampão de eluição Dynabeads em células Vero e L929.

Legenda: Efeito citopático após 24 horas do tampão de eluição Dynabeads a 10, 5 e 2% (v/v) em células Vero (A, B e C), em células L929 (D, E e F). Fonte: Giovanni, DNS 2014.

4.5.2 Determinação do efeito antiviral

O efeito antiviral do material purificado por coluna de afinidade (obtido no item 4.4.2) foi testado em cultivos de células L929 infectadas com EMC (Figura 11). Foi observado que a proteína recombinante AVLOEc-N-C-His obtida, foi capaz de reduzir o título viral em até 100.000 vezes em relação ao controle de vírus. Em células L929 coradas com cristal violeta, após 72 horas de infecção com vírus E.M.C., pode-se observar que AVLOEc-N-C-His pode proteger as células, com de e 20 µg/ml de HisTrap-D-AVLOEc-N-C-His protegeu 10^5 vezes (Figura 37 A); com 180 µg/ml e 60 µg/ml de HisTrap-FF-AVLOEc-N-C-His protegeu 10^4 e 10^2 vezes respectivamente (Figura 37 B e C). O controle célula estava integro (Figura 37 D), o controle de vírus afetou até a diluição 3 (Figura 37 E) e o controle contendo 6 mM de imidazol apresentou efeito citopático diferente em todas as diluições (Figura 37 F).

Tabela 5 - Título de picornavírus (EMC) em cultivos de células L929 tratado com AVLOEc-N-C-His.

	Título do picornavírus (EMC) 72 horas após infecção (TCID₅₀ mL⁻¹)	Redução
Cultivo controle infectado	5,314x10 ⁵	-
20,0 µg/ml de AVLOEc-N-C-His dialisado	0	10⁵x
180,0 µg/ml de AVLOEc-N-C-His com 6 mM imidazol	27	10⁴x
60,0 µg/ml de AVLOEc-N-C-His com 6 mM imidazol	243	10²x
6 mM de imidazol	5,314x10 ⁵	-

Legenda: Os cultivos células L929 foram tratados ou não tratados com AVLOEc-N-C-His. Os títulos virais estão expressos em TCID₅₀/mL. (TCID₅₀: *Tissue culture infectious dose 50%*). Os valores representam a média de 3 experimentos. Fonte: Giovanni, DNS 2014.

Figura 37 - Teste de atividade antiviral da proteína AVLOEc-N-C-His em células L929 infectadas com Vírus EMC.

Legenda: Células L929 coradas com cristal violeta após 72 horas de infecção com Vírus E.M.C. com título inicial a $5,314 \times 10^5$ diluído na razão 3. **A** - 20,0 µg/ml de HisTrap-D-AVLOEc-N-C-His infectado com título de $5,314 \times 10^5$; **B** - 180,0 µg/ml de HisTrap-FF-AVLOEc-N-C-His infectado com título de $1,968 \times 10^4$; **C** - 60,0 µg/ml de HisTrap-FF-AVLOEc-N-C-His infectado com título de $7,29 \times 10^2$; **D** - Controle de Célula; **E** - Controle de vírus com título 3 de diluição viral e **F** - Controle de Tampão 30 mM de imidazol com título 1 de vírus. Fonte Giovanni, DNS 2014

4.5.3 Reação de PCR em tempo real quantitativa

Foi avaliado o efeito inibitório das amostras Dyna-GF-AVLOEc-N-C-His 0,98 µg/ml, Dyna-GF-AVLOEc-N-His 1,42 µg/ml, GF-AVLOEc-N-C-His 1,02 µg/ml, GF-AVLOEc-N-His 0,98 µg/ml obtidas no item 4.4.3 e das amostras HisTrap-D-AVLOEc-N-His 10,87 µg/ml, HisTrap-D-AVLOEc-N-C-His 40,44 µg/ml e HisTrap-D-AVLOEc-N-C-His 2,56 µg/ml obtidas no item 4.4.2 sobre a replicação do vírus da rubéola e do vírus do herpes. Foi utilizado como parâmetros de avaliação, controle de células infectadas e controle de células não infectadas. A extração do RNA total foi feita 96 horas após a infecção e os níveis de transcrição de rubéola e de herpes intracelular foram mensurados. As curvas padrões resultantes mostraram que a eficiência de amplificação para ambos os vírus estava entre 95% e 100%, com coeficientes de correlação superiores a 0,99. Os resultados da qPCR mostraram um nível significativamente reduzido de transcrição da rubéola e do herpes nas células inoculadas em 4 dias após a infecção viral em comparação ao controle de células.

4.5.3.1 Herpes

Para o vírus da Herpes foi observado uma redução na transcrição em células tratadas com AVLOEc-N-His e AVLOEc-N-C-His purificadas por diversos métodos em todas as diluições (10^{-4} a 10^{-10}) avaliadas, na diluição 10^{-6} as amostras abaixo de 1,5 µg/ml (Dyna-GF-AVLOEc-N-C-His 0,98 µg/ml, Dyna-GF-AVLOEc-N-His 1,42 µg/ml, GF-AVLOEc-N-C-His 1,02 µg/ml, GF-AVLOEc-N-His 0,98 µg/ml) apresentaram uma redução em torno de 50% da transcrição e as amostras acima de 2,5 µg/ml (HisTrap-D-AVLOEc-N-His 10,87 µg/ml, HisTrap-D-AVLOEc-N-C-His 40,44 µg/ml e HisTrap-D-AVLOEc-N-C-His 2,56 µg/ml) a redução foi em torno de 80% da transcrição. Nas 4 últimas diluições (10^{-7} a 10^{-10}) não foi detectado níveis detectáveis de transcrição de vírus da Herpes em todas as concentrações testadas (Figura 38).

Figura 38 - qPCR para Herpes vírus (DNA).

Legenda: Células Vero infectadas pelo vírus do herpes e controle de células não infectado, avaliados após 96 horas de infecção. Amostras infectadas tratadas com amostras Dyna-GF-AVLOEc-N-C-His 0,98 µg/ml, Dyna-GF-AVLOEc-N-His 1,42 µg/ml, GF-AVLOEc-N-C-His 1,02 µg/ml, GF-AVLOEc-N-His 0,98 µg/ml, HisTrap-D-AVLOEc-N-His 10,87 µg/ml, HisTrap-D-AVLOEc-N-C-His 40,44 µg/ml e HisTrap-D-AVLOEc-N-C-His 2,56 µg/ml. Fonte: Giovanni, DNS 2014.

4.5.3.2 Rubéola

O vírus da Rubéola mostrou uma redução na transcrição em células tratadas em relação ao controle de infecção em todas as diluições avaliadas (10^{-1} a 10^{-5}), na diluição 10^{-3} as amostras Dyna-GF-AVLOEc-N-C-His 0,98 µg/ml, Dyna-GF-AVLOEc-N-His 1,42 µg/ml, GF-AVLOEc-N-C-His 1,02 µg/ml e GF-AVLOEc-N-His 0,98 µg/ml apresentaram uma redução em torno de 50% da transcrição. As amostras HisTrap-D-AVLOEc-N-His 10,87 µg/ml, HisTrap-D-AVLOEc-N-C-His 40,44 µg/ml e HisTrap-D-AVLOEc-N-C-His 2,56 µg/ml apresentaram uma redução em torno de 80%. A partir da diluição 10^{-4} não foi detectada níveis detectáveis de transcrição de vírus da rubéola em todas as concentrações testadas (Figura 39).

Figura 39 - qPCR para vírus da Rubéola (RNA).

Legenda: Células SIRC infectadas pelo vírus da rubéola (MOI 0,1) e controle de células não infectado, avaliados após 96 horas de infecção. Amostras infectadas tratadas com amostras Dyna-GF-AVLOEc-N-C-His 0,98 µg/ml, Dyna-GF-AVLOEc-N-C-His 1,42 µg/ml, GF-AVLOEc-N-C-His 1,02 µg/ml, GF-AVLOEc-N-C-His 0,98 µg/ml, HisTrap-D-AVLOEc-N-C-His 10,87 µg/ml, HisTrap-D-AVLOEc-N-C-His 40,44 µg/ml e HisTrap-D-AVLOEc-N-C-His 2,56 µg/ml. Fonte: Giovanni, DNS 2014.

5 DISCUSSÃO

5.1 Expressão da proteína recombinante.

Os níveis expressão das proteínas *AVLOEc-N-His* e *AVLOEc-N-C-His* induzidas com 1mM de IPTG a 37 °C por 4 horas não apresentaram um rendimento alto, como pode ser visualizado na Figura 22, entretanto, a expressão produziu uma proteína solúvel (Figura 29) e biologicamente ativa (item 0).

A eficiência e alto nível de expressão de proteína recombinante em *E. coli* depende de vários fatores, tais como: promotor forte, estabilidade de mRNA e plasmídeo, frequência de códons, acúmulo de biomassa e condição de fermentação, favoráveis para a obtenção de alta produtividade com baixo custo agregado (JANA; DEB, 2005; TERPE, 2006; TOMAZETTO, 2006).

Nos organismos vivos são encontrados dois tipos de códons: os códons principais, que são mais frequentes, e os raros, que requerem RNAt não abundantes na célula. Estes tipos de códons influenciam diretamente na velocidade de tradução, uma vez que os códons principais, estão disponíveis em mais número na célula, são traduzidos de forma mais rápida (ANGOV et al., 2011; CALDERONE et al., 1996). A *AVLOEc* clonada e expressa nesse trabalho apresenta um códon com uma frequência baixa (Figura 14) na posição 46, o códon CTA é o mais raro de Leucina em *E. coli* (ANEXO A). Quando raros, podem prejudicar o padrão de expressão uma vez que ao se deparar com os mesmos, os ribossomos são capazes de realizar uma pausa no processo de tradução, permitindo o desligamento do RNA mensageiro (mRNA), diminuindo então, a produtividade da proteína (KHOW; SUNTRARACHUN, 2012).

A coexpressão de RNAt dos códons raros mostram bons resultados no aumento dos níveis de expressão (ANGOV et al., 2011; TOLIA; JOSHUA-TOR, 2006), segundo ANGOV et al. (2008), aumentou significativamente a expressão de uma proteína nativa de *P. falciparum* em *E. coli* com a otimização dos códons na sequência, trocando-se na sequência dos códons mais raros para os mais frequentes do organismo a ser expresso.

No entanto, para se otimizar a produção de uma proteína recombinante é necessário levar todos os parâmetros para obtenção da proteína nas condições ideais. Estas modificações podem aumentar junto com o rendimento, a formação de

corpos de inclusão e problemas de conformação produzindo grandes quantidades de uma proteína sem atividade biológica (ANGOV et al., 2011; KHOW; SUNTRARACHUN, 2012). Para as proteínas AVLOEc, modificar os códons não necessariamente irá trazer uma melhora na quantidade de proteína biologicamente ativa expressa, otimizar essa etapa exigirá um grande estudo nos parâmetros utilizados.

5.2 Purificação da proteína recombinante

A purificação das proteínas recombinantes AVLOEc-N- His e AVLOEc-N-C-His mostraram-se eficiente por todos os processos. A recuperação, de acordo com os níveis de proteína produzida foram bons em todos os processos utilizados, tanto para purificação por afinidade por *beads* magnéticas, com o kit Dynabeads His-tag (Novex) (4.4.1), como os métodos pelo AKTA purifier, acoplado com a coluna de afinidade HisTrap FF (GE Healthcare) de 5 ml (4.4.2) ou com a coluna de gel filtração Superdex™75 10/300GL (GE Healthcare) de 24 ml (4.4.3).

De acordo com a Figura 29 a purificação por *beads* magnéticas mostrou uma quantidade menor de proteínas contaminantes aderidas junto com a proteína de interesse em relação a purificação utilizando a coluna de afinidade HisTrap (

Figura 31). Segundo a bula da coluna HisTrap FF e o Guia GE Healthcare (2007) utilizar uma quantidade entre 20 mM e 40 mM de imidazol no tampão de ligação e lavagem reduziria a quantidade de proteína contaminante aderida, entretanto não ocorreu adesão de proteína a coluna com essa quantidade, necessitando otimizar o processo para conseguir proteína com uma maior pureza.

A purificação por Dynabeads apresentou um rendimento bom e uma pureza visualmente melhor pelos géis de SDS-PAGE (Figura 29 e

Figura 31) entretanto ele foi avaliado em uma escala pequena, para microtubos de até 2 ml a quantidade final de proteína recuperada por experimento foi muito menor que o conseguido com a coluna HisTrap FF de 5 ml.

Os ensaios de atividade antiviral utilizaram amostras advindas de diferentes processos de purificação (item 4.4) e a combinação de alguns processos foram eficientes para reduzir a toxicidade proveniente do imidazol das amostras purificadas por afinidade. Combinar a purificação por *beads* magnéticas e em seguida purificar por gel filtração (Dyna-GF-AVLOEc-N-C-His e Dyna-GF-AVLOEc-N-His) mostrou

eficiente para retirar o imidazol, pois as amostras não apresentaram citotoxicidade e os resultados dos ensaios de qPCR foram excelentes.

5.3 Citotoxicidade

A citotoxicidade são modificações que geram alterações celulares em diversos processos metabólicos, homeostáticos, reprodutivos entre outros, interferindo na sua sobrevivência (NARDONE, 1977).

A necessidade dos testes de citotoxicidade são importantes para verificar a toxicidade de novos biofármacos e seus veículos nos estágios iniciais de desenvolvimento de biomoléculas, pois o potencial terapêutico de um composto é um balanço entre seus efeitos farmacológicos versus seus efeitos toxicológicos (FRESHNEY, 2010).

Estes testes *in vitro* são necessários para definição da citotoxicidade basal, ou seja, a dose mínima que pode causar danos as funções celulares básicas e morte celular. Com isso, é possível definir a dose máxima para testes *in vitro* e fornecer informações significativas sobre outros parâmetros como a toxicidade dos solventes ou até mesmo uma possível interação entre solvente e composto. A literatura mostra a importância da identificação de agentes que não demonstrem toxicidade para as células para que sua aplicação seja viável (OLICARD et al., 2005; OURTH, 2004; PETRICEVICH; MENDONÇA, 2003).

Nas amostras de sobrenadante de primeira lavagem (AVLOEc-N-His e AVLOEc-N-C-His (Figura 34), após 24 horas não foi observado o efeito citopático, após 72 horas foi observado toxicidade nas concentrações acima de 100 µg/ml em ambas linhagens, algo esperado, pois o material não passou por nenhum processamento e contém uma quantidade muito alta de lipopolissacarídeos de membrana, um composto extremamente pirogênico em doses residuais após o processo de purificação (FONTANA et al., 2014).

O imidazol é um composto tóxico para diversos tipos celulares, nas linhagens tumorais HepG2 e V79-4 após 24 horas, apresentam uma dose necessária para inibir 50% das células tumorais (IC₅₀) 42,3 e 65,9 mM respectivamente (LINARES, 2013). Porém, no tampão de eluição que contém 300 mM de imidazol (item 0) utilizado nos testes, a dose letal foi muito menor para as linhagens Vero e L929, usando a 30 mM (10% v/v) em 24 horas destruiu todas as células do poço em

ambas as linhagens (Figura 36 A e D), utilizando uma dose de 15 mM (5% v/v) destruiu mais de 50% das células em ambas as linhagens (Figura 36 B e E) e a 6 mM (2% v/v) não causou efeito citopático após 24 horas de contato. Após 72 horas, as 3 concentrações mostraram-se tóxicas em ambas as linhagens.

Um resultado inusitado aconteceu quando testou-se as amostras Dyna-AVLOEc-N-His e Dyna-AVLOEc-N-C-His que também continham a proteína antiviral e o imidazol (Figura 35), respectivamente nas concentrações de 30 µg/ml (30 mM), 15 µg/ml (15 mM) e 6 µg/ml (6 mM) não apresentou efeito citotóxico em 24 horas de contato, porém, após 72 horas de incubação, as 3 concentrações mostraram sinais de toxicidade em ambas as linhagens proporcional a quantidade de amostra.

5.4 Antiviral

O composto antiviral ideal é aquele que não interfere na célula hospedeira e que tenha amplo espectro de inibição da replicação viral. Os testes de atividade antiviral mostraram resultados satisfatórios contra vírus pertencentes a famílias virais *Picornaviridae*, *Herpesviridae* e *Togaviridae*.

A família *Picornaviridae*, formada pelos gêneros: *Aphthovirus*, *Cardiovirus*, *Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Rinovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus* e *Teschovirus*, apresenta vírus não envelopados, formados por um RNA fita simples (ssRNA) de polaridade positiva. O genoma, formado por uma única ORF (matriz aberta de leitura), é poliadenilado na região 3' e apresenta na região 5' uma pequena proteína covalentemente ligado a sua extremidade (RYAN; FLINT, 1997; WITWER et al., 2001).

CARMO et al. (2012) (APÊNDICE A) testou atividade antiviral para proteína recombinante obtida em sistema baculovírus contra o vírus EMC em linhagem de célula L929. Neste caso a hemolinfa bruta da lagarta reduziu o vírus em 91 vezes e a proteína expressa em sobrenadante de cultivo e a purificada por gel filtração seguida de afinidade reduziram respectivamente 1069 e 9687 vezes em relação ao controle de vírus EMC.

Na Figura 37 e Tabela 5 é possível visualizar o teste de atividade antiviral em EMC com a proteína *AVLOEc-N-C-His*, purificado por afinidade (obtido no item 4.4.2) com título inicial a $5,31 \times 10^5$ (Figura 11). Este recombinante apresentou uma excelente capacidade de reduzir o título viral em relação ao controle de vírus.

Utilizando 20 µg/ml de HisTrap-D-AVLOEc-N-C-His reduziu o vírus em pelo menos 10^5 vezes em relação ao controle (Figura 37 A). Entretanto quando se utilizou material sem dialisar, aplicando diretamente o eluído pela coluna de afinidade (contendo 6 mM de imidazol) nas concentrações de 180 µg/ml e 60 µg/ml de HisTrap-FF-AVLOEc-N-C-His reduziu em 10^4 e $\times 10^2$ vezes o título viral em relação ao controle respectivamente (Figura 37 B e C). O imidazol presente mostrou-se tóxico, mas mesmo com quantidades 9 e 3 vezes maiores de AVLOEc-N-C-His a resposta foi 10 e 1000 vezes menor que a recombinante dialisada.

As infecções pelo vírus EMC, são costumeiras em camundongos, entretanto casos em humanos já foram relatados (DREXLER et al., 2008). Os Picornavírus, afetam humanos e animais com grande abrangência, sendo os causadores das Hepatites, da poliomielite e os rinovírus responsáveis pelos resfriados. O desenvolvimento de antivirais contra esse grupo, são alvo de inúmeras pesquisas, como a vacinação para a prevenção de várias doenças ocasionadas por estes tipos virais ainda não existe, os antivirais mostram uma alternativa terapêutica interessante (NORDER et al., 2011).

HSV-1 e HSV-2 são agentes patogênicos muito comuns em humanos responsáveis por um grande número de doenças, como as ulcerações orais e genitais e alguns casos mais raros, cegueira e encefalites virais e ainda infecções disseminadas em neonatos e imunodeprimidos (BERNARD et al., 2007). São vírus da Família *Herpesviridae*, Subfamília *Alphaherpesvirinae*, Gênero *Simplexvirus*, Espécie Herpes simplex vírus 1 ou Herpes simplex vírus 2 e possuem genoma de dupla fita de DNA, capsídeo icosaédrico e envelope lipídico (MELCHJORSEN et al., 2009).

As proteínas AVLOEc-N-C-His e AVLOEc-N-His incubadas 1 hora antes com células Vero mostraram uma redução dos níveis de transcrição do Herpes vírus em todas as diluições após 96 horas. Houve uma diminuição de 50% para as amostras entre 1,0 e 1,5 µg/ml e de 80% nas amostras acima de 2,5 µg/ml na diluição 10^{-6} . Nas 4 últimas diluições (10^{-7} a 10^{-10}) não foi detectado níveis significativos de transcrição de vírus da Herpes em todas as concentrações testadas (Figura 38). Para a mesma proteína antiviral expressa em sistema baculovírus / célula de inseto, a redução significativa foi detectada abaixo de 10^{-5} e a partir de 10^{-9} e 10^{-10} não foi detectado níveis significativos de transcrição viral (CARMO et al., 2014) (APÊNDICE B).

HSV-1 e HSV-2 através de complexos de receptores de glicoproteína entram nas células hospedeiras. Ambos expressam as glicoproteínas gB, gC e gD, gE e gL. Todas, exceto a gC são essenciais para a entrada da célula hospedeira, mas a ausência de gC reduz a eficiência da invasão. Através da glicoproteína gC ocorre o primeiro contato com a célula hospedeira e a ligação com o proteoglicano de membrana sulfato de heparina (HS) (BERNARD et al., 2007).

Estudos mostram um papel importante do IFN $\alpha\beta$ na resposta celular antiviral, entretanto não é possível avaliar se a eliminação viral é por mecanismo direto ou por mecanismos imunoreguladores indiretos. O resultado da infecção por HSV é dependente do equilíbrio entre a propagação de vírus e uma resposta imune eficaz. Expressão apropriada de IFNs, citocinas e quimiocinas mostra-se essencial para uma eficiente defesa do hospedeiro contra a infecção (CARMO et al., 2014; KOTENKO, 2011; MELCHJORSEN et al., 2009).

A rubéola é uma causa comum de erupção e febre na infância. É importante para a saúde pública e está relacionada com os efeitos teratogênicos gravíssimos no primeiro trimestre de gestação (EDLICH et al., 2005), trata-se de vírus da Família Togaviridae, Género *Rubivirus* e espécie *Rubella vírus* possui genoma de RNA fita simples com sentido positivo, com um capsídeo icosaédrico e um envelope bilipídico (HOBMAN; CHANTLER, 2007).

As proteínas AVLOEc-N-C-His e AVLOEc-N-His incubadas 1 hora antes com células SIRC mostraram uma redução dos níveis de transcrição viral em todas as diluições. Na diluição 10^{-3} em dose entre 1,0 e 1,5 $\mu\text{g/ml}$ reduziu 50% a transcrição viral, já com dose acima de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ a inibição chegou a 80% (Figura 39), a partir de 10^{-4} não foi observada níveis detectáveis de transcrição. Carmo et al. (2014) (APÊNDICE B) analisando a mesma proteína expressa em sistema Baculovírus/célula de inseto obteve uma redução significativa nas diluições a partir de 10^{-5} e uma redução a níveis não detectáveis somente a partir da diluição 10^{-10} .

Sugerimos que as AVLOEc pode induzir alterações celulares internas que podem afetar a replicação do vírus, por exemplo, através da indução de IFN. Além disso, o interferon alfa e gama restringem a replicação do vírus, reduzindo os níveis de RNA viral na célula e inibindo a sua tradução (HOBMAN; CHANTLER, 2007). Corroborando estes dados, foi verificado que linhagens celulares infectadas com Rubéola vírus [BSC1, BHK (estas células não possuem o receptor de IFN tipo I), RK13 (coelho), e HeLa (humano)] não responderam a administração de INF

exógeno. A infecção em cultura de células manteve-se resistente ao tratamento de IFN (STANWICK; HALLUM, 1974).

Pelos dados obtidos até o momento, a ação antiviral AVLOEc ocorre de forma intracelular pela ativação de algum mecanismo interno. Acreditamos que esteja ativando algum mecanismo da célula que iniba a replicação ou a montagem viral. Temos observado ainda que a hemolinfa afeta a produção de interferon, TNF e óxido nítrico, que são agentes inespecíficos da proteção dos organismos. No entanto, o vírus EMC foi capaz de se replicar em células tratadas com IFN, fazendo-se necessário a investigação dos mecanismos antivirais (CARMO, 2012). Isto pode ser interessante principalmente no que tange ao vírus da influenza, uma vez que apresenta uma nova via de ação antiviral. Pois os fármacos utilizados concentram-se na inibição da penetração da partícula viral na célula, como a adamantina e rimantadina, ou inibidores de neuraminidase, que atuam impedindo a liberação das partículas virais das células infectadas (MATROSOVICH et al., 2004; MONTTO et al., 2006).

Outras análises para entender seu mecanismo de ação e aplicabilidade *in vivo* são essenciais. No entanto, com os resultados anteriores e no presente estudo, pode-se concluir que esta macromolécula tem o potencial de se tornar um agente antiviral promissor com atividade de largo espectro.

6 CONCLUSÕES

- O sistema bacteriano foi eficiente para expressar as proteínas antivirais solúveis e ativas, portanto, as modificações pós traducionais não foram necessárias.
- A presença de uma ou duas caudas de histina, não apresentou diferença na atividade antiviral e na proteção das células contra o imidazol.
- 20 µg/ml de AVLOEc apresentou uma excelente atividade antiviral em EMC reduzindo o título viral em até 100.000 vezes.
- Foi observado uma redução na transcrição viral de rubéola por PCR em tempo real quantitativa em célula SIRC pre incubada com AVLOEc, a partir da concentração de 1 µg/ml em todas diluições virais e após a diluição 10^{-4} não foi possível detectar níveis significativos de transcrição.
- Foi observado uma redução na transcrição viral do Herpes por PCR em tempo real quantitativa em célula Vero pre incubada com AVLOEc, a partir da concentração de 1 µg/ml em todas as diluições virais e e após a diluição 10^{-7} não foi possível detectar níveis significativos de transcrição.
- A proteína antiviral recombinante apresentou uma proteção à células Vero e L929 contra a toxicidade do imidazol.

REFERENCIAS§

ABERNATHY, E. et al. Confirmation of rubella within 4 days of rash onset: comparison of rubella virus RNA detection in oral fluid with immunoglobulin M detection in serum or oral fluid. J. Clin. Microbiol., v. 47, n. 1, p. 182-188, 2009.

ALVAREZ FLORES, M. P. et al. Losac, a factor X activator from *Lonomia obliqua* bristle extract: its role in the pathophysiological mechanisms and cell survival. Biochem Biophys. Res. Commun., v. 343, n. 4, p. 1216-1223, 2006.

ANGOV, E. et al. Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host. PLoS One, v. 3, n. 5, p. e2189, 2008.

ANGOV, E. et al. Adjustment of Codon Usage Frequencies by Codon Harmonization Improves Protein Expression and Folding. In: J. T. C. Evans e M.-Q. Xu (Ed.). Heterologous Gene Expression in E.coli: Humana Press, v.705, 2011. Adjustment of Codon Usage Frequencies by Codon Harmonization Improves Protein Expression and Folding, p. 1-13. (Methods in Molecular Biology).

BANEYX, F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. Curr. Opin. Biotechnol., v. 10, n. 5, p. 411-421, 1999.

BELLÃO, C. Avaliação de fontes de carbono e condições de indução na expressão de canacistatina em Escherichia coli BL21 (DE3). 2006. 90 f. (Dissertação de Mestrado) - Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

BELZHELARSKAIA, S. N. [Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect and mammalian cells]. Mol. Biol. (Mosk), v. 45, n. 1, p. 142-159, 2011.

BERNARD, R. et al. Herpes virus. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 2502-2601.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., v. 72, p. 248-254, 1976.

BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 68, n. 3, p. 283-291, 2005.

§ De acordo com:

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

CALDERONE, T. L. et al. High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol., v. 262, n. 4, p. 407-412, 1996.

CARMO, A. C. et al. Expression of an antiviral protein from *Lonomia obliqua* hemolymph in baculovirus/insect cell system. Antiviral Res., v. 94, n. 2, p. 126-130, 2012.

CARMO, A. C. et al. Discovery of a new antiviral protein isolated *Lonomia obliqua* analysed by bioinformatics and real-time approaches. Cytotechnology, 2014.

CARMO, A. C. V. Expressão de proteína antiviral de *Lonomia obliqua* em Sistema baculovírus/Célula de inseto. 2012. 137 f. (Tese). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia,, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

CARRIJO-CARVALHO, L. C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. The venom of the *Lonomia* caterpillar: an overview. Toxicon, v. 49, n. 6, p. 741-757, 2007.

CHEN, G. T.; INOUE, M. Role of the AGA/AGG codons, the rarest codons in global gene expression in *Escherichia coli*. Genes Dev., v. 8, n. 21, p. 2641-2652, 1994.

CHERNYSH, S. et al. Antiviral and antitumor peptides from insects. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., v. 99, n. 20, p. 12628-12632, 2002.

CHOI, J. H.; LEE, S. Y., Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 64, n. 5, p. 625-635, 2004.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. et al. Toxins from *Lonomia obliqua* — Recombinant Production and Molecular Approach. In: RÁDIS-BAPTISTA, G. (Ed.). An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications: InTech. Toxins from *Lonomia obliqua* — Recombinant Production and Molecular Approach, 2013.

COTTER, S. C.; WILSON, K. Heritability of immune function in the caterpillar *Spodoptera littoralis*. Heredity (Edinb.), v. 88, n. 4, p. 229-234, 2002.

CUETO, A. P. et al. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. Ciência Rural, v. 41, p. 1800-1806, 2011.

DE LIMA-NETTO, S. et al. Antiviral effect of the egg wax of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). Cytotechnology, v. 64, n. 5, p. 601-606, 2012.

DELCROIX, M.; RILEY, L. W. Cell-Penetrating Peptides for Antiviral Drug Development. Pharmaceuticals, v. 3, n. 3, p. 448-470, 2011.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol. Adv., v. 27, n. 3, p. 297-306, 2009.

DOWNEY, W. Biopharma Contract Manufacturing Organizations Update. Contract Pharma. USA: Rodman Media, 2014.

DREXLER, J. F. et al. Circulation of 3 lineages of a novel Safford cardiovirus in humans. Emerg. Infect. Dis., v. 14, n. 9, p. 1398-1405, 2008.

EDLICH, R. F. et al. Rubella and congenital rubella (German measles). J. Long. Term. Eff. Med. Implants., v. 15, n. 3, p. 319-328, 2005.

EMERY, S. L. et al. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. Emerg. Infect. Dis., v. 10, n. 2, p. 311-316, 2004.

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

FONTANA, C. et al. Structural studies and biosynthetic aspects of the O-antigen polysaccharide from *Escherichia coli* O42. Carbohydr. Res., 2014.

FRESHNEY, R. I. Cytotoxicity. In: _____. (Ed.). Culture of Animal Cells: John Wiley & Sons, Inc., 2010. p. 365-381.

FUHRMANN, M. et al. Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. Plant. Mol. Biol., v. 55, n. 6, p. 869-881, 2004.

GE, H. Affinity Chromatography Principles and Methods Handbook. Uppsala Sweden: G. E. Company, 2007. 153 p.

GLICK, B. R. et al. Molecular Biotechnology: principles and applications of recombinant dna. Washington: American Society for Microbiology, 2009.

GRECO, K. N. et al. Antiviral activity of the hemolymph of *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). Antiviral Res., v. 84, n. 1, p. 84-90, 2009.

GROSS, J. et al. Antimicrobial activity of exocrine glandular secretions, hemolymph, and larval regurgitate of the mustard leaf beetle *Phaedon cochleariae*. J. Invertebr. Pathol., v. 72, n. 3, p. 296-303, 1998.

GUERRERO, B. et al. Effect on platelet FXIII and partial characterization of Lonomin V, a proteolytic enzyme from *Lonomia achelous* caterpillars. Thromb. Res., v. 93, n. 5, p. 243-252, 1999.

HAMDAOUI, A. et al. 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, n. 1, p. 74-78, 1998.

HANNIG, G.; MAKRIDES, S. C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. Trends Biotechnol., v. 16, n. 2, p. 54-60, 1998.

HEINEN, T. E.; DA VEIGA, A. B. Arthropod venoms and cancer. Toxicon, v. 57, n. 4, p. 497-511, 2011.

HEINEN, T. E. et al. Effects of *Lonomia obliqua* caterpillar venom upon the proliferation and viability of cell lines. Cytotechnology, v. 66, n. 1, p. 63-74, 2014.

HIRAKI, A. et al. Antiviral substance from silkworm faeces: purification and its chemical characterization. Biol. Pharm. Bull., v. 20, n. 5, p. 547-555, 1997.

HOBMAN, T.; CHANTLER, J. Rubella virus. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. v. 1, p. 1069-1100.

HUANG, T.-K.; MCDONALD, K. A. Molecular Farming Using Bioreactor-Based Plant Cell Suspension Cultures for Recombinant Protein Production Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects. In: A. Wang e S. Ma (Ed.): Springer Netherlands, 2012. Molecular Farming Using Bioreactor-Based Plant Cell Suspension Cultures for Recombinant Protein Production Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects, p. 37-67.

HUBERMAN, A. et al. A hyperglycemic peptide hormone from the Caribbean shrimp *Penaeus (litopenaeus) schmitti*. Peptides, v. 21, n. 3, p. 331-338, 2000.

INVITROGEN™. BL21 Star™(DE3)pLysS One Shot® Chemically Competent Cells. In: (Ed.). An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins. USA: LifeTechnologies, v.25-0402, 2010. BL21 Star™(DE3)pLysS One Shot® Chemically Competent Cells, p.24.

JANA, S.; DEB, J. K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 67, n. 3, p. 289-298, 2005.

JIANG, H. et al. Four serine proteinases expressed in *Manduca sexta* haemocytes. Insect. Mol. Biol., v. 8, n. 1, p. 39-53, 1999.

JOHNS, R. et al. Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. J. Med. Entomol., v. 35, n. 4, p. 458-464, 1998.

JOHNSON, I. S. Human insulin from recombinant DNA technology. Science, v. 219, n. 4585, p. 632-637, 1983.

JONES, G. et al. Hormonal regulation and properties of a new group of basic hemolymph proteins expressed during insect metamorphosis. J. Biol. Chem., v. 268, n. 2, 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, pt. 4, p. 1135-1141, 2000.

KEEN, H. et al. Human insulin produced by recombinant DNA technology: safety and hypoglycaemic potency in healthy men. Lancet, v. 2, n. 8191, p. 398-401, 1980.

KHOW, O.; SUNTRARACHUN, S. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. Asian Pac. J. Trop. Biomed., v. 2, n. 2, p. 159-162, 2012.

KOTENKO, S. V. IFN-lambdas. Curr. Opin. Immunol., v. 23, n. 5, p. 583-590, 2011.

KURATA, K. et al. Purification and characterization of a juvenile hormone binding protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. Comp. Biochem. Physiol. P. B Biochem. Mol. Biol., v. 109, n. 1, p. 105-114, 1994.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANZ-MENDOZA, H. et al. Regulation of the insect immune response: the effect of hemolin on cellular immune mechanisms. Cell. Immunol., v. 169, n. 1, p. 47-54, 1996.

LEE, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. Trends Biotechnol., v. 14, n. 3, p. 98-105, 1996.

LEHNINGER, A. L. et al. Lehninger Principles of Biochemistry. W. H. Freeman, 2005.

LIMA-NETTO, S. et al. An interesting antimicrobial activity of egg wax from *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). Systematic & Applied Acarology, v. 16, n. 1, 2011.

LIN, C. Y. et al. Identification and characterization of a hyperglycemic hormone from freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol., v. 121, n. 4, p. 315-321, 1998.

LINARES, I. A. P. Estudos citotóxicos de moléculas antitumorais e antiparasitárias em células de câncer de fígado (HepG2) e de fibroblasto de hamster (V79-4). 2013. 77 f. (Dissertação) - Instituto de Química de São Carlos Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

LOWENBERGER, C. et al. 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, n. 29, p. 20092-20097, 1999.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiological Reviews, v. 60, n. 3, p. 512-538, 1996.

MARANGA, L. et al. Enhancement of Sf-9 cell growth and longevity through supplementation of culture medium with hemolymph. Biotechnol. Prog., v. 19, n. 1, p. 58-63, 2003.

MATROSOVICH, M. N. et al. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. J. Virol., v. 78, n. 22, p. 12665-12667, 2004.

MAZZUCHELLI-DE-SOUZA, J. et al. Expression and in Silico analysis of the recombinant bovine papillomavirus E6 protein as a model for viral oncoproteins studies. Biomed. Res. Int., v. 2013, p. 421398, 2013.

MCDONALD, K. A. 2.32 - Heterologous Protein Expression. In: MURRAY, M.-Y. (Ed.). Comprehensive Biotechnology. 2nd ed. Burlington: Academic Press, 2011.

MELCHJORSEN, J. et al. Activation and evasion of innate antiviral immunity by herpes simplex virus. Viruses, v. 1, n. 3, p. 737-759, 2009.

MENDONÇA, R. Z. et al. Study of kinetic parameters for the production of recombinant rabies virus glycoprotein. Cytotechnology, v. 60, n. 1-3, p. 143-151, 2009.

MONTO, A. S. et al. Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. Antimicrob. Agents Chemother., v. 50, n. 7, p. 2395-2402, 2006.

NARDONE, R. M. Toxicity testing in vitro. In: ROTHBLAT, G. H.; CRISTOFALO, J. (Ed.). Growth, nutrition and metabolism of cells in culture. New York: Academic Press, 1977. p. 471-495.

NETTLESHIP, J. E. et al. Recent advances in the production of proteins in insect and mammalian cells for structural biology. J. Struct. Biol., v. 172, n. 1, p. 55-65, 2010.

NORDER, H. et al. Picornavirus non-structural proteins as targets for new anti-virals with broad activity. Antiviral Res., v. 89, n. 3, p. 204-218, 2011.

NOVAGEN. Pet System Manual. Darmstadt, Germany: EMD Biosciences, 2005. 80 p.

OBBARD, D. J.; DUDAS, G. The genetics of host-virus coevolution in invertebrates. Curr. Opin. Virol., v. 8C, p. 73-78, 2014.

OLICARD, C. et al. Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Antiviral Res., v. 66, n. 2-3, p. 147-152, 2005.

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

OURTH, D. D.; RENIS, H. E. Antiviral melanization reaction of *Heliothis virescens* hemolymph against DNA and RNA viruses in vitro. Comp. Biochem. Physiol. B., v. 105, n. 3-4, p. 719-723, 1993.

PAN, J. et al. Broad antiviral activity in tissues of crustaceans. Antiviral Res., v. 48, n. 1, p. 39-47, 2000.

PETERS, I. D. et al. Isolation and characterization of an antifreeze protein precursor from transgenic *Drosophila*: evidence for partial processing. Biochim. Biophys. Acta., v. 1171, n. 3, p. 247-254, 1993.

PETRICEVICH, V. L.; MENDONÇA, R. Z. Inhibitory potential of *Crotalus durissus terrificus* venom on measles virus growth. Toxicon, v. 42, n. 2, p. 143-153, 2003.

PINTO, A. F. et al. *Lonomia obliqua* venom: In vivo effects and molecular aspects associated with the hemorrhagic syndrome. Toxicon, v. 56, n. 7, p. 1103-1112, 2010.

POPHAM, H. J. et al. Potent virucidal activity in larval *Heliothis virescens* plasma against *Helicoverpa zea* single capsid nucleopolyhedrovirus. J. Gen. Virol., v. 85, pt. 8, p. 2255-2261, 2004.

RADER, R. A. (Re)defining biopharmaceutical. Nat. Biotech., v. 26, n. 7, p. 743-751, 2008.

RADER, R. A. Top 50 (or so) Biopharma Products - Ranking the top 57 biopharma products by 2011 revenues. Contract Pharma. USA: Rodman Media, 2012.

RADER, R. A. FDA Biopharmaceutical product approvals and trends in 2012. BioProcess International, v. 11, p. 18-27, 2013.

REED, L. J.; MUENCH, H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS. Am. J. Epidemiol., v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

REIS, C. V. et al. Lopap, a prothrombin activator from *Lonomia obliqua* belonging to the lipocalin family: recombinant production, biochemical characterization and structure-function insights. Biochem. J., v. 398, n. 2, p. 295-302, 2006.

REIS, C. V. et al. In vivo characterization of Lopap, a prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom. Thromb. Res., v. 102, n. 5, p. 437-443, 2001.

REIS, C. V. et al. A prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom (Lopap) biochemical characterization. Thromb. Res., v. 102, n. 5, p. 427-436, 2001.

REYES-RUIZ, J. M.; BARRERA-SALDANA, H. A. Proteins in a DNA world: expression systems for their study. Rev. Invest. Clin., v. 58, n. 1, p. 47-55, 2006.

ROSENFELD, A.; VANDERBERG, J. P. Identification of electrophoretically separated proteases from midgut and hemolymph of adult *Anopheles stephensi* mosquitoes. J. Parasitol., v. 84, n. 2, p. 361-365, 1998.

ROTH, G. Y. Top 10 Biopharma Report - Our annual look at the 10 biggest players in the Biopharmaceutical marketplace. Contract Pharma. USA: Rodman Media, 2013.

RYAN, M. D.; FLINT, M. Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. J. Gen. Virol. v. 78, pt. 4, p. 699-723, 1997.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001

SAMUELSON, J. C. Recent developments in difficult protein expression: a guide to E. coli strains, promoters, and relevant host mutations. Methods Mol. Biol., v. 705, p. 195-209, 2011.

SHIOTSUKI, T. et al. Characterization and affinity purification of juvenile hormone esterase from *Bombyx mori*. Biosci. Biotechnol. Biochem., v. 64, n. 8, p. 1681-1687, 2000.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. J. Biotechnol., v. 115, n. 2, p. 113-128, 2005.

SOUSA, A. P. et al. Improved replication of the baculovirus *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) in vitro using proteins from *Lonomia obliqua* hemolymph. Cytotechnology, 2014.

SOUZA, A. P. et al. Purification and characterization of an anti-apoptotic protein isolated from *Lonomia obliqua* hemolymph. Biotechnol. Prog., v. 21, n. 1, p. 99-105, 2005.

STANWICK, T. L.; HALLUM, J. V. Role of interferon in six cell lines persistently infected with rubella virus. Infect. Immun., v. 10, n. 4, p. 810-815, 1974.

SU, L. et al. Extracellular overexpression of recombinant *Thermobifida fusca* cutinase by alpha-hemolysin secretion system in E. coli BL21(DE3). Microb. Cell. Fact., v. 11, p. 8, 2012.

SU, L. et al. A novel strategy for enhancing extracellular secretion of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 97, n. 15, p. 6705-6713, 2013.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 72, n. 2, p. 211-222, 2006.

TIPPMANN, H. F. Analysis for free: comparing programs for sequence analysis. Brief. Bioinform., v. 5, n. 1, p. 82-87, 2004.

TOLIA, N. H.; JOSHUA-TOR, L. Strategies for protein coexpression in *Escherichia coli*. Nat. Methods., v. 3, n. 1, p. 55-64, 2006.

TOMAZETTO, G. Estudo da estabilidade do plasmídeo e da expressão de jaburetox-2Ec em Escherichia coli BL 21 utilizando lactose como indutor. 2006. 72 f. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular., Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências, São Paulo, 2006.

VEIGA, A. B. et al. A catalog for the transcripts from the venomous structures of the caterpillar *Lonomia obliqua*: identification of the proteins potentially involved in the coagulation disorder and hemorrhagic syndrome. Gene., v. 355, p. 11-27, 2005.

VEIGA, A. B. G. Caracterização molecular dos componentes do veneno de *Lonomia obliqua* : genes expressos e princípios ativos envolvidos nos distúrbios da coagulação e da fibrinólise. 2005. 118 f. (Tese). Instituto de Biociências - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2005.

VIEIRA, H. L. et al. Improvement of recombinant protein production by an anti-apoptotic protein from hemolymph of *Lonomia obliqua*. Cytotechnology., v. 62, n. 6, p. 547-555, 2010.

WATZINGER, F. et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. J. Clin. Microbiol., v. 42, n. 11, p. 5189-5198, 2004.

WEN, F. H.; DUARTE, A. C. Acidentes por *Lonomia*. In: CARDOSO, J. L. C. et al. (Ed.). Animais peçonhentos no Brasil – biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 224-232.

WITWER, C. et al. Conserved RNA secondary structures in Picornaviridae genomes. Nucleic. Acids. Res., v. 29, n. 24, p. 5079-5089, 2001.

WONG, G. et al. Characterization of host immune responses in Ebola virus infections. Expert. Rev. Clin. Immunol., v. 10, n. 6, p. 781-790, 2014.

YAMAMOTO, Y. et al. Purification and characterization of Bombyx cysteine proteinase specific inhibitors from the hemolymph of Bombyx mori. Arch. Insect. Biochem. Physiol., v. 42, n. 2, p. 119-129, 1999.

YOON, S. H. et al. Secretory production of recombinant proteins in Escherichia coli. Recent. Pat. Biotechnol., v. 4, n. 1, p. 23-29, 2010.

ZHU, S. et al. Evidence for the existence of insect defensin-like peptide in scorpion venom. IUBMB Life., v. 50, n. 1, p. 57-61, 2000.

Expression of an antiviral protein from *Lonomia obliqua* hemolymph in baculovirus/insect cell system

A.C.V. Carmo^{a,b,d}, D.N.S. Giovanni^{b,d}, T.P. Corrêa^a, L.M. Martins^d, R.C. Stocco^b, C.A.T. Suazo^a, R.H.P. Moraes^d, A.B.G. Veiga^c, R.Z. Mendonça^{d,*}

^a Laboratório de Tecnologia de Cultivo Celular, Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, SP, Brazil

^b Laboratório de Genética, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

^c Departamento de Ciências Básicas da Saúde, UFGPA, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 March 2011

Revised 17 November 2011

Accepted 13 December 2011

Available online 30 December 2011

Keywords:

Antiviral
Insect cells
Baculovirus
Antiviral protein
Hemolymph
Lonomia obliqua

ABSTRACT

The control of viral infections, mainly those caused by influenza viruses, is of great interest in Public Health. Several studies have shown the presence of active properties in the hemolymph of arthropods, some of which are of interest for the development of new pharmacological drugs. Recently, we have demonstrated the existence of a potent antiviral property in the hemolymph of *Lonomia obliqua* caterpillars. The aim of this study was to produce an antiviral protein in a baculovirus/Sf9 cell system. The resulting bacmid contains the sequence coding for the antiviral protein previously described by our group. Total RNA from *L. obliqua* caterpillars was extracted with Trizol and used in the reverse transcription assay with oligo(dT) primer followed by polymerase chain reactions (RT-PCR) with specific primers for the cDNA coding for the antiviral protein, based on the sequence deposited in the GenBank database. Restriction sites were inserted in the cDNA for ligation in the donor plasmid pFastBac1™. The recombinant plasmid was selected in *Escherichia coli* DH5α and subsequently used in the transformation of *E. coli* DH10Bac for the construction of the recombinant bacmid. This bacmid was used for the expression of the antiviral protein in the baculovirus/Sf9 cell system. After identifying the protein by western blot, activity tests were performed, showing that the purified recombinant protein was able to significantly reduce viral replication (about 4 logs). Studies on the optimization of the expression system for the production of this antiviral protein in insect cells are in progress.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The first licensed human therapeutic protein using the recombinant DNA technology was insulin, produced in 1982 on a large scale in *Escherichia coli*. However, due to the impossibility to express complex proteins with post-translational modifications in bacteria, animal cells have become a more attractive alternative for industrial purposes (Butler, 2005). Animal cell cultures were developed in the last decade of the 19th century with the first attempts to hold pieces of fabric in plasma or biological fluids for several days or weeks. Since then, Technology of Animal Cell Cultures has achieved great progress, and is currently one of the most successful tools in biotechnology (Kretzmer, 2002).

Animal cell cultures require a complex medium, often supplemented with expensive bovine serum which provides essential proteins, such as growth factors, that have to be removed during downstream processing (Reyes-Ruiz and Barrera-Saldana, 2006). An attractive alternative is the use of the expression in the baculovirus/insect cell system described by Smith et al. (1983). This system is widely used as a tool for the production of recombinant proteins that require complex post-translational modifications (Carpentier et al., 2001). Glycosylation, which is the addition of carbohydrates (glycans) to proteins synthesized by animal cells, is one of the examples of post-translational modification. The parameters of cell culture – such as nutrients, oxygen, toxic metabolites, concentration, pH and temperature – may have significant effects on the glycan structure distribution in recombinant proteins, and therefore require efficient control (Butler, 2005).

Several proteins are also targets of the biotechnology industry due to their large commercial interest. In this context, the caterpillar *Lonomia obliqua* gained great prominence in biotechnology in Brazil, owing to the active properties identified in its venom and in its hemolymph (Veiga et al., 2005), which can interfere in blood

* Corresponding author. Address: Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 3726 7222x2281; fax: +55 11 3726 1505.

E-mail addresses: zucattelli@uol.com.br, zucattelli@butantan.gov.br (R.Z. Mendonça).

coagulation and fibrinolysis (Veiga et al., 2003), enhance cell growth (Maranga et al., 2003), act as anti-apoptotic agent (Souza et al., 2005) improve recombinant protein production (Mendonça et al., 2009, 2008; Vieira et al., 2010) and demonstrate antiviral effect (Greco et al., 2009).

The present study describes a system for the protein expression in Sf9/baculovirus cells using the recombinant DNA to obtain a protein from the *L. obliqua* caterpillar that displays a potent antiviral action (Greco et al., 2009). This protein is found in the hemolymph of *L. obliqua* caterpillars, and its encoding cDNA sequence is the basic element for the construction of the expression system. The large protein expression allows the analysis of its function and biochemical characterization. This is the preliminary description of the baculovirus/Sf9 cell system used for the expression of this antiviral protein from the hemolymph of *L. obliqua* caterpillar.

2. Materials and methods

2.1. Determination of protein and cDNA sequences and construction of the recombinant protein

2.1.1. Sequence determination and primer design

The design of primers specific for the amplification of the cDNA coding for the putative antiviral protein was based on the protein and cDNA sequences. For identification of the protein sequence, *L. obliqua* hemolymph was purified and the fraction containing the antiviral property was analyzed by SDS-PAGE; the N-terminal sequence of the antiviral protein was determined by Maldi-Q-ToF mass spectrometry (Wattenberg et al., 2002). In order to identify the cDNA coding for the protein of interest, the N-terminal sequence was analyzed against cDNA libraries of *L. obliqua* tegument and spicules (Veiga et al., 2005), using all possible translation frames of each cDNA. The sequence of the respective cDNA was used for primer design and further cDNA amplification by PCR. Restriction sites were also included in the primer sequence for further ligation in the plasmid pFastBac1™ (Invitrogen), as well as a His-tag sequence.

Antiviral response of the baculovirus has been reported in the literature (Gronowski et al., 1999) and the histidine tag can stimulate the immune system response (Masek et al., 2011). Therefore, we also amplified and cloned sequences of two other proteins (LOH-19-AY829833 and 8-LOH) that have molecular weights similar to the protein with the histidine sequence, to confirm that the protective effects observed in the results would be due to the action of the antiviral protein from *L. obliqua* (20-LOH-JN807330) and not a response of the immune system to the His-tag sequence (Masek et al., 2011; Veiga et al., 2005).

2.1.2. RNA extraction and RT-PCR

A *L. obliqua* caterpillar specimen was cross-sectioned in the middle, the extremities were cut off and RNA was extracted from the remaining portion with Trizol (Invitrogen) according to the Manufacturer's instructions. The RNA was stored at -80°C until use.

The first-strand cDNA was synthesized using Oligo(dT)₁₈ Primer (Fermentas) and Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen).

For amplification of the sequence of interest, PCRs consisting of 12.5 μl PCR Master Mix (Promega), 200 ng of cDNA and 10 μM of each specific primer were carried out in a thermocycler under the following reaction conditions: initial cycle at 94°C for 3 min; 35 cycles at 94°C for 1 min and 30 s, a temperature gradient ranging from 45°C to 55°C for 1 min and 30 s, and 72°C for 1 min and 30 s; final extension at 72°C for 10 min.

Amplification products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gel containing ethidium bromide (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

2.1.3. Cloning in pFastBac1

The pFastBac1™ donor vector (Invitrogen™) was used in a first cloning step. For cloning reactions, both the vector and the amplified cDNAs were digested with BamHI and HindIII restriction enzymes.

After overnight incubation at 16°C , the ligation reaction was employed in the transformation of *E. coli* DH5 α (Invitrogen™). Bacteria were grown on plates containing LB medium and ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Twenty colonies were selected for growth in liquid Luria-Bertani (LB) containing ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). For selection of colonies containing the recombinant donor plasmid, cultures were analyzed by PCR using the primers specific for the cDNA of the antiviral protein and other proteins. Agarose gel electrophoresis (1%) was performed to verify the amplified products.

To confirm that the insert was appropriately ligated into the cloning vector, clones screened by PCR and restriction enzyme digestion were also subjected to sequence analyses with primers Seq Forward pFastBac1™ (5'-AAATGATAACCATCTCGC-3') and Seq Reverse pFastBac1™ (5'-CAAGCAGTGATCAGATCCAGACAT-3'). The cycle sequencing reactions were performed using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (code 4337456, Applied Biosystems). Capillary electrophoresis and sequence analyses were performed in an ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems), using 36 cm capillaries loaded with the POP7 polymer. Sequences were analyzed in the Sequencing Analysis 5.3.1 software.

2.1.4. Recombinant bacmid

After the generation of the pFastBac1™ construct (with the cDNA of the antiviral protein and of the other proteins), the purified plasmid DNAs were transformed into DH10Bac™ *E. coli* for transposition into the bacmid. Identification of the colonies containing the recombinant bacmid was based on blue/white colony selection.

2.1.5. Isolation and analysis of the recombinant bacmid

Extraction of bacmids was performed according to the Manufacturer's protocol (Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, Invitrogen). To verify the presence of the gene of interest after transposition, PCRs with M13 primers were used. The obtained amplicons were further sequenced using the pFastBac1™ primers for confirmation of the presence of the gene of interest in the bacmid after transposition.

2.1.6. Transfection of insect cells

Transfection of insect cells with the recombinant bacmid was performed according to the Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System manual (Invitrogen™). Sf9 cells in the log phase ($1.5\text{--}2.5 \times 10^6$ cells/ml, greater than 95% viability) were used in the experiment, using 500 ng of the recombinant baculovirus for transfection. Cell morphology was observed daily post infection for signs of viral infection. After 144 h, the supernatant was collected and considered as the first passage of the recombinant baculovirus.

To confirm the nucleotide sequence of the recombinant protein, a sample from a culture infected with a second pass was collected after 72 h. After extraction of DNA and RNA, PCR and RT-PCR were carried out respectively, as previously indicated.

DNA samples resulting from the PCR were subjected to nucleotide sequencing with the forward and reverse primers used for the amplification of the cDNAs.

The supernatant of all crops was collected daily for the determination of cell number, nutrient, titration of baculovirus and recombinant protein identification (data not shown). Western blot with anti-His antibody (GE Healthcare) and studies of cell morphology with photomicrographs were performed after each step.

2.2. Analytical procedures

2.2.1. L929 cell cultures

L929 cells were grown in plastic T-flasks or on multiwell plates using Leibovitz-15 (L15) medium containing 0.9 g L^{-1} of D-galactose, 0.3 g L^{-1} of L-glutamine and supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS). Viable cell counts were performed on Neubauer chambers using the Trypan blue (0.05%) exclusion method.

2.2.2. Determination of the virus infectious dose

In order to determine the amount of virus produced in cultures infected with the EMC virus that can be blocked by the antiviral recombinant protein (rAVLO), L929 was treated or not treated with 1% v/v of rAVLO, 1 h prior to culture infection. Then, cells were infected with the EMC virus at different dilutions (rates of 10). The microwell plates containing EMC-infected cells were then incubated at 37°C for 3 days as described by Griffiths and Thornton (1982). The titers of virus produced in infected cells (treated or not treated with rAVLO) were determined by monitoring the cytopathic effect (CPE) in an endpoint dilution assay and the results were expressed as the highest dilution of virus able to induce CPE in 50% of cells.

3. Results

The protein responsible for the antiviral effect of *L. obliqua* hemolymph was isolated and purified by gel filtration chromatography using a Superdex 75 column (Greco et al., 2009). Then, the semi-purified fraction containing the antiviral activity was applied onto an ion-exchange Resource-Q column. As previously demonstrated by our group (Greco et al., 2009), the antiviral protein purified by this procedure decreased the production of measles virus (from $3.3 \pm 1.25 \times 10^7$ to $2.1 \pm 1.5 \times 10^5$ TCID₅₀/ml) by 157 times the production of poliovirus ($2.8 \pm 1.08 \times 10^9$ to $4.58 \pm 1.42 \times 10^7$ TCID₅₀/ml) by 61 times. These differences were significant at $p < 0.05$. The mass spectrometry was used to determine the N-terminal of the protein. Further, the N-terminal sequence was analyzed against previously constructed *L. obliqua* cDNA libraries (Veiga et al., 2005).

3.1. Generation of sequences of proteins of interest

RNA was extracted and the cDNA was generated as described in Section 2. The samples were analyzed on 1% agarose gels, in which a band of 587 bp was observed, confirming the amplification of the cDNA that codes for the antiviral protein (Fig. 1A). The sequences of the cDNA coding for the other proteins (LOH-19-AY829833,

663 pb, and 8-LOH, 963 pb) were also confirmed by agarose gel electrophoresis (Fig. 1B).

3.2. Cloning in pFastBac1™

The amplified cDNA coding for the antiviral protein was cloned in the pFastBac1™ donor plasmid. As observed by agarose gel electrophoresis in Fig. 1A, the cloned cDNA had an expected size of 587 bp for the antiviral protein, 663 bp for LOH-19-AY829833 and 963 bp for 8-LOH (Fig. 1B).

E. coli DH5α cells were transformed to the recombinant donor plasmid, plasmid-containing colonies were selected and the purified plasmid was subsequently used in the transformation of *E. coli* DH10Bac™ for the construction of the recombinant bacmids. These bacmids, containing the sequence of a protein with antiviral activity and other proteins, were further used for the expression of this protein in the baculovirus/Sf9 cells system (as shown below).

3.3. Generation of the recombinant bacmid

After bacterial transformation with the recombinant plasmids rAVLO-pFastBac1™, LOH-19-pFastBac1™ and 8-LOH-pFastBac1™, white and blue colonies were observed in the plates. White colonies were indicative that successful transposition occurred, while blue colonies indicated that the bacmid remained unchanged.

3.4. Confirmation of the recombinant bacmid

Colonies with recombinant bacmids were analyzed by PCR followed by 1% agarose gel electrophoresis, in which baculovirus transposition was confirmed by the appearance of DNA bands 2887 for antiviral protein (Fig. 2), 2963 for LOH-19 protein and 3263 for 8-LOH protein (data not shown).

3.5. Transfection of insect cells

The recombinant plasmids were selected in *E. coli* DH5α and subsequently used in the transformation of *E. coli* DH10Bac for the construction of recombinant bacmids. These bacmids, containing the sequence of the protein with antiviral activity and other chosen proteins, were used for the expression of the proteins in a baculovirus/Sf9 cells system. Three passages of the recombinant virus were performed in Sf9 cell cultures so far. At the moment, titers of the baculovirus obtained in the different passages as well as the antiviral activity of the recombinant protein produced in this system were determined.

To eliminate the possibility that the observed effect is due to characteristics of the construct other than the antiviral activity

Fig. 1. (A) Agarose gel electrophoresis (1%) confirming amplification of the cDNA that codes for the antiviral protein (line 2 and 3). (B) Agarose gel electrophoresis (1%) confirming amplification of the cDNA that codes for other proteins (line 7 for 8-LOH and line 9 for LOH-19-AY829833), M: molecular marker (1 kb Ladder, New England Biolabs).

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis (1%) confirming baculovirus transposition with amplification of the respective products. (Line 1 M: molecular marker (1 kb ladder, New England BioLabs), line 2 baculovirus without transposition, line 3 and 4 rAVLO 2300 bp + 591 bp protein = 2891 bp and line 5 amplification of sequence of rAVLO with amplification primers.)

itself, we used the same approach and procedures to construct recombinant bacmids expressing other *L. obliqua* proteins, namely LOH-19 and 8-LOH (Veiga et al., 2005). These two recombinant bacmids, as well as an empty bacmid were used to treat Sf-9 cells infected with a picornavirus. The results showed that the empty bacmid or those expressing the other recombinant proteins were not effective in inhibiting the replication of EMC virus, presenting results similar to those of the control of infected cells and of the untreated cells. On the other hand, when infected cultures were treated with the recombinant antiviral, there was a reduction of about 3 logs in the viral titers in comparison to that of controls. Therefore, when the purified antiviral protein was used, the reduction in virus produced was around 4 logs, showing that the recombinant antiviral protein remained fully active (Table 1). We are currently testing the effect of the antiviral purified recombinant protein on enveloped viruses (measles, rubella and herpes simplex). Preliminary data have shown that the purified recombinant protein is able to reduce by at least 4 logs the replication of the rubella virus and by about 6 logs the replication of the herpes simplex virus (data not shown).

To facilitate purification, a His-tag sequence was included in the C-terminal region of the proteins rAVLO, LOH-19-AY829833 and 8-LOH. The protein was separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Sambrook and Russell, 2001). After transfer, the membrane was marked with the anti-histidine antibody to confirm the presence of the protein. The result is shown in Fig. 3. As can be seen, there was the presence of a band with strong labeling with the antibody, demonstrating the expression of the antiviral protein.

4. Discussion

Viral diseases affect hundreds of millions of people worldwide every year. Even though some antiviral drugs are under clinical

Table 1

Production of the picornavirus (EMC), in L929 cell cultures treated or not treated with whole hemolymph (1%), whole or purified antiviral recombinant protein (rAVLO) or other baculovirus recombinant protein (Rec 8-LOH). The cells were treated 1 h before infection. The virus titers are expressed as CCID₅₀/ml.

	Poliovirus titers 72 h after infection (TCID ₅₀ /ml)	Reduction
Control infected culture	$3.1 \times 10^9 \pm 1.3 \times 10^9$	
Hb	$3.4 \times 10^7 \pm 2.1 \times 10^{8a}$	91×
rAVLO (whole)	$2.9 \times 10^6 \pm 3.63 \times 10^{5a}$	1069×
rAVLO (purified)	$3.2 \times 10^5 \pm 3.56 \times 10^{4a}$	9687×
Rec 8-LOH	$4.3 \times 10^9 \pm 1.14 \times 10^9$	

CCID₅₀: cell culture infectious dose 50%.

The values represent the average of three experiments.

^a Indicates values at $p < 0.05$.

Fig. 3. Western blot of samples of a portion of AKTA (ion exchange) showing the presence of the antiviral protein. The proteins present in the nitrocellulose membrane were revealed with an antibody anti histidine. rAVLO: recombinant protein with antiviral activity, negative control and positive control.

trials, 50% of them are directed toward the treatment of HIV. Therefore, there is a need for the development of antiviral agents specific for emerging newly-recognized human pathogens (such as SARS coronavirus and influenza viruses H5N1 and H1N1) (Delcroix and Riley, 2011). Recently, various studies have reported the antiviral properties in products obtained from arthropods. Popham et al. (2004) have reported significant reduction in the titers of the baculovirus HzSNPV due to the action of an antiviral protein present in the hemolymph of *H. virescens* larvae. Chernysh et al. (2002) have isolated two peptides, alloferon 1 and 2, from the hemolymph of *Calliphora vicina*, which control viral infection when added before infection. Olicard et al. (2005) observed that the addition of the hemolymph of *Crassostrea gigas* to VERO cell cultures inhibits HSV-1. Extracts of crustacean tissues have also shown a broad spectrum antiviral activity against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses, probably through multiple inhibitors contained in the extracts (Pan et al., 2000). Hultmark et al. (1980) have reported some antimicrobial properties of a protein of 15 kDa isolated from *Hyalophora cecropia* caterpillars. Alloferon, a 12.65 kDa protein purified from the hemolymph of the fly *C. vicina*, effectively inhibited the reproduction of influenza A and B viruses by triggering intracellular responses when added before virus infection similar to the interferons of vertebrates (Chernysh et al., 2002). An antiviral peptide of 916 Da, isolated from *H. virescens* hemolymph, provided protection against virus infection (Ourth, 2004). Recently, our group has purified an antiviral protein of approximately 20 kDa from the hemolymph of *L. obliqua*; when added to cultures 1 h before infection, this protein was able to inhibit the replication of all viruses tested in the respective study (Greco et al., 2009).

In the present study, we cloned and expressed a recombinant antiviral protein of *L. obliqua* caterpillar, named rAVLO. Furthermore, our results confirmed that the recombinant protein displayed the antiviral effect observed in the native protein present in the hemolymph. As a matter of fact, the recombinant protein was able to inhibit the replication of picornavirus. It was also observed that the hemolymph did not display any virucidal effect,

suggesting that it may act on different stages of virus replication, similar to alloferon, or on the late stages of virus infection, as demonstrated by Popham et al. (2004) with a peptide extracted from *H. virescens*.

In this study, the antiviral activity of *L. obliqua* hemolymph against human viruses was determined *in vitro* and the protein was characterized by mass spectrometry. The protocols used for the amplification of the cDNA of the proteins and its cloning in pFastBac1™ were shown to be efficient. The obtained bacmids, containing the sequence of a protein with antiviral activity, were used for the expression of this protein in Sf9 cell cultures. As shown, rAVLO was able to block the replication of the encephalomyocarditis virus, a non-enveloped virus, indicating that rAVLO kept the antiviral activity of the native protein from the hemolymph. Based on these results, we propose that a protein present in the hemolymph of the caterpillar *L. obliqua* displays the antiviral activity and plays a putative role in insect immunity. Studies on the activity of the recombinant protein with enveloped virus (rubella virus, herpes simplex virus and measles virus) were performed. In this case, the virus replication was inhibited by about 4 logs for the rubella virus and about 6 logs for the herpes simplex virus (data not shown).

The production of this protein is being optimizing both in Sf9 and in UFLAG insect cells; we are also determining the stability of rAVLO, as well as defining the effective dose of the protein.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of FAPESP (2008/57263-5) and CAPES.

References

- Butler, M., 2005. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 283–291.
- Carpentier, E., Lebesgue, D., Kamen, A.A., Hogue, M., Bouvier, M., Durocher, Y., 2001. Increased production of active human beta(2)-adrenergic/G(alphas) fusion receptor in Sf-9 cells using nutrient limiting conditions. *Protein Expr. Purif.* 23, 66–74.
- Chernysh, S., Kim, S.J., Bekker, G., Pleskach, V.A., Filatova, N.A., Anikin, V.B., Platonov, V.G., Bulet, P., 2002. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 12628–12632.
- Delcroix, M., Riley, L.W., 2011. Cell-penetrating peptides for antiviral drug development. *Pharmaceuticals* 3, 448–470.
- Greco, K.N., Mendonca, R.M., Moraes, R.H., Mancini, D.A., Mendonca, R.Z., 2009. Antiviral activity of the hemolymph of *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). *Antiviral Res.* 84, 84–90.
- Griffiths, B., Thornton, B., 1982. Use of microcarrier culture for the production of herpes simplex virus (type 2) in MRC-5 cells. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 32, 324–329.
- Gronowski, A.M., Hilbert, D.M., Sheehan, K.C., Garotta, G., Schreiber, R.D., 1999. Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. *J. Virol.* 73, 9944–9951.
- Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., Boman, H.G., 1980. Insect immunity, purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* 106, 7–16.
- Kretzmer, G., 2002. Industrial processes with animal cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 135–142.
- Maranga, L., Mendonca, R.Z., Bengala, A., Peixoto, C.C., Moraes, R.H., Pereira, C.A., Carrondo, M.J., 2003. Enhancement of Sf-9 cell growth and longevity through supplementation of culture medium with hemolymph. *Biotechnol. Prog.* 19, 58–63.
- Masek, J., Bartheldyova, E., Turanek-Knotigova, P., Skrabalova, M., Korvasova, Z., Plockova, J., Koudelka, S., Skodova, P., Kulich, P., Krupka, M., Zachova, K., Czemkova, L., Horynova, M., Kratochvilova, I., Miller, A.D., Zyk, D., Michalek, J., Vrbkova, J., Sebel, M., Ledvina, M., Raska, M., Turanek, J., 2011. Metallochelating liposomes with associated lipophilised norAbuMDP as biocompatible platform for construction of vaccines with recombinant His-tagged antigens: preparation, structural study and immune response towards rHsp90. *J. Control. Release* 151, 193–201.
- Mendonca, R.Z., Greco, K.N., Moraes, R.H., Astray, R.M., Baral, M., 2009. Study of kinetic parameters for the production of recombinant rabies virus glycoprotein. *Cytotechnology* 60, 143–151.
- Mendonca, R.Z., Greco, K.N., Sousa, A.P., Moraes, R.H., Astray, R.M., Pereira, C.A., 2008. Enhancing effect of a protein from *Lonomia obliqua* hemolymph on recombinant protein production. *Cytotechnology* 57, 83–91.
- Olicard, C., Renault, T., Torhy, C., Benmansour, A., Bourgognon, N., 2005. Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Res.* 66, 147–152.
- Ourth, D.D., 2004. Antiviral activity against human immunodeficiency virus-1 *in vitro* by myristoylated-peptide from *Heliothis virescens*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 190–196.
- Pan, J., Kurosky, A., Xu, B., Chopra, A.K., Copenhagen, D.H., Singh, I.P., Baron, S., 2000. Broad antiviral activity in tissues of crustaceans. *Antiviral Res.* 48, 39–47.
- Popham, H.J., Shelby, K.S., Brandt, S.L., Coudron, T.A., 2004. Potent virucidal activity in larval *Heliothis virescens* plasma against *Helicoverpa zea* single capsid nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.* 85, 2255–2261.
- Reyes-Ruiz, J.M., Barrera-Saldana, H.A., 2006. Proteins in a DNA world: expression systems for their study. *Rev. Invest. Clin.* 58, 47–55.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Smith, G.E., Fraser, M.J., Summers, M.D., 1983. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. *J. Virol.* 46, 584–593.
- Souza, A.P., Peixoto, C.C., Maranga, L., Carvalho, A.V., Moraes, R.H., Mendonca, R.M., Pereira, C.A., Carrondo, M.J., Mendonca, R.Z., 2005. Purification and characterization of an anti-apoptotic protein isolated from *Lonomia obliqua* hemolymph. *Biotechnol. Prog.* 21, 99–105.
- Veiga, A.B.G., Pinto, A.F.M., Guimarães, J.A., 2003. Fibrinolytic and procoagulant activities in the hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thromb. Res.* 111, 95–101.
- Veiga, A.B., Ribeiro, J.M., Guimarães, J.A., Francischetti, I.M., 2005. A catalog for the transcripts from the venomous structures of the caterpillar *Lonomia obliqua*: identification of the proteins potentially involved in the coagulation disorder and hemorrhagic syndrome. *Gene* 355, 11–27.
- Vieira, H.L., Pereira, A.C., Peixoto, C.C., Moraes, R.H., Alves, P.M., Mendonca, R.Z., 2010. Improvement of recombinant protein production by an anti-apoptotic protein from hemolymph of *Lonomia obliqua*. *Cytotechnology* 62, 547–555.
- Wattenberg, A., Organ, A.J., Schneider, K., Tyldesley, R., Bordoli, R., Bateman, R.H., 2002. Sequence dependent fragmentation of peptides generated by MALDI quadrupole time-of-flight (MALDI Q-TOF) mass spectrometry and its implications for protein identification. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, 772–783.

Cytotechnology
DOI 10.1007/s10616-014-9740-1

ORIGINAL RESEARCH

Discovery of a new antiviral protein isolated *Lonomia obliqua* analysed by bioinformatics and real-time approaches

Ana Carolina Viegas Carmo · Lilian Hiromi Tomanari Yamasaki ·
Cristina Adelaide Figueiredo · Dalton Nogueira da Silva Giovanni ·
Maria Isabel de Oliveira · Fabiana Cristina Pereira dos Santos ·
Suely Pires Curti · Paula Rahal · Ronaldo Zucatelli Mendonça

Received: 9 December 2013 / Accepted: 3 May 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract This study presents a new recombinant protein that acts as a powerful antiviral (rAVLO—recombinant Antiviral protein of *Lonomia obliqua*). It was able to reduce the replication by 10^6 fold for herpes virus and by 10^4 fold for rubella virus. RT-PCR of viral RNA rAVLO treated infected cells also showed similar rate of inhibition in replication. The analysis of this protein by bioinformatics suggests that this protein is globular, secreted with a signal peptide and has the ability to bind to MHC class I. It was found that there are several protein binding sites with

various HLA and a prevalence of α -helices in the N-terminal region (overall classified as a α/β protein type). BLAST similarity sequence search for corresponding cDNA did not reveal a similar sequence in Genbank, suggesting that it is from a novel protein family. In this study we have observed that this recombinant protein and hemolymph has a potent antiviral action. This protein was produced in a baculovirus/Sf-9 system. Therefore, these analyses suggest that this novel polypeptide is a candidate as a broad spectrum antiviral.

Keywords Antiviral · *Lonomia obliqua* · Bioinformatics

Ana Carolina Viegas Carmo, Lilian Hiromi Tomanari Yamasaki and Cristina Adelaide Figueiredo have contributed equally to the preparation of this manuscript.

A. C. V. Carmo (✉) · D. N. da Silva Giovanni ·
R. Z. Mendonça
Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan,
São Paulo Cep. 05503-000, Brazil
e-mail: viegasacc@gmail.com

L. H. T. Yamasaki · D. N. da Silva Giovanni · P. Rahal
Laboratório de Estudos Genômicos, IBILCE-UNESP,
São Paulo, Brazil

C. A. Figueiredo · D. N. da Silva Giovanni ·
M. I. de Oliveira · F. C. P. dos Santos
Núcleo de Doenças Respiratórias, Centro de Virologia,
Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

D. N. da Silva Giovanni · S. P. Curti
Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial, Centro de
Virologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

Introduction

Viral infections are a subject of considerable interest, especially in the human, animal and plant health fields. Because there are still many diseases with no efficient treatment available, the search for new strategies is extremely important. Development of these agents are also important to overcome the frequent occurrence of micro-organisms resistant to drugs (Lohner and Staudegger 2001). Therefore, new therapies for human viral diseases strongly rely on the discovery of new therapeutic agents (Kao et al. 2010). For influenza treatment, for example, there are four antiviral agents approved and currently in use. However, Kao and coworkers (2010) already

reported that H1N1 could easily develop resistance to Tamiflu, based on gene sequencing and structure prediction of neuraminidase. Zanamivir is an agent which also belongs to the neuraminidase inhibitor class and it is active against influenza A and B. The drugs amantadine and rimantadine belong to the adamantane class known as being effective only against influenza A virus (Fiore et al. 2011). Antiviral activity is also described in many bioproducts which are investigated for new drug development. These products can be produced by animals, plants or bacteria. Nowadays, development of new therapies for important diseases such as AIDS (Acquired Immuno Deficiency Syndrome) and those caused by new strains of viruses (SARS Coronavirus, Influenza viruses H5N1 and H1N1) is a major topic (Delcroix and Riley 2011; Heinen and da Veiga 2011).

Insects can be highlighted in this scenario. Several studies have demonstrated the antiviral effect of substances synthesized by this group. The fact that these organisms are found inhabiting all the planet ecosystems, leads to believe that they have developed protection mechanisms to survive in these places. Susceptible to a variety of viral infections, insect resistance mechanisms are at present little known. Identification of these pathways stimulates the search for new agents which can be applied to human infections (Chernysh et al. 2002; Yao et al. 2006). Antiviral activity molecules are found in different compounds and insect species (Chernysh et al. 2002; Cueto et al. 2011; Ourth 2004; Popham et al. 2004). A recently identified protein (AVLO) of approximately 20 kDa, purified from the hemolymph of *Lonomia obliqua* is able of inhibiting the replication of measles, polio and influenza viruses when added to the cell cultures 1 h before infection (Greco et al. 2009). It was observed in this study that the hemolymph does not show any virucidal effect, suggesting that it may act at different stages of virus replication.

In another study, this protein was successfully expressed in the baculovirus system and the antiviral activity was tested. It showed that the purified recombinant protein could significantly reduce viral replication (10,000 times) of a Picornavirus (EMC) (Carmo et al. 2012).

Therefore, the antiviral activity confirmation and development of in vitro expression led us to proceed to the investigation of these new protein features. Further

understanding of structure, function and mechanism of action of this macromolecule are essential to evaluate its potential to be established as a wide range antiviral agent.

In the present study, we tested the antiviral activity in Herpes and Rubella virus, characterized physics and biologic properties of a novel protein from *L. obliqua* hemolymph by different in silico approaches. This protein presented antiviral activity for several virus infections in cell culture, described in previous studies of our group (Carmo et al. 2012; Greco et al. 2009). Therefore, this protein property instigates our attention as a potential new antiviral drug and elucidating its properties and mechanisms of actions is a great step in drug development.

Materials and methods

Analytical procedures

Cells

The SIRC cells (rabbit cornea—CCL-60 from ATCC (Manassas, VA, USA)) and the Vero cell lines (African green monkey kidney- ATCC CCL-81) were grown in 75 cm² plastic cell culture flasks, in DMEM medium (Dulbecco's minimum Eagle essential medium) supplemented with 10 % inactive fetal bovine serum (FBS), 20 mM L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Hemolymph

For this study, the hemolymph of *L. obliqua* was collected from sixth instar larvae after setae had been cut off and its purified fractions were obtained from gel filtration chromatography system as described by Greco et al. (2009).

Determination of the cytotoxic effect

The cytotoxic effects of the hemolymph were assessed by using a standard VERO cell assay. The confluent cell cultures were exposed to different amounts of hemolymph (0.5, 1, 2, 5 and 10 %, v/v) and incubated for 72 h in triplicates. Analysis where performed at 24, 48 and 72 h of incubation. Daily, the supernatants were removed and the remaining living cells were counted after being fixed and stained with crystal

violet (0.2 % in methanol 20 %). Cytotoxicity percentage values were calculated by the formula: $(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100$. Data are expressed as the mean $\pm$ SD. Statistical analysis was performed using the Student's *t* test and the level of significance was set at $p \leq 0.05$.

Antiviral recombinant protein (rAVLO)

The antiviral protein used in this study was a recombinant protein from *L. obliqua* expressed in a baculovirus/insect cell system as described by Carmo et al. (2012).

Antiviral effect of hemolymph and of a recombinant protein (rAVLO) on infected cells

Vero and SIRC cells were cultivated to approximately 90 % confluence in 96 well plates in DMEM, supplemented with 2 mM L-glutamine and 10 % FCS. Plates were incubated at 37 °C in a humidified 5 % CO₂ atmosphere. The confluent cells were inoculated with 10 μ L of the purified hemolymph, clone 5 (an empty bacmid) and the recombinants 10 (rAVLO clone 10), 16 (rAVLO clone 16) or 23 (rAVLO clone 23) in duplicate. After 1 h of incubation, these cells were infected with viruses from the infected cultures, at dilutions of 10^{-1} – 10^{-7} for rubella virus and 10^{-5} – 10^{-12} for herpes virus. Following, they were incubated as previously described for 4 days. In addition, for the determination of the hemolymph effect on the infected cells, real time PCR was performed.

Determination of the virus infectious dose

The confluent monolayers were dispersed with 0.2 % trypsin and 0.02 % versene, and re-suspended in DMEM growth medium with 100 IU/ml penicillin G and 100 mg/ml streptomycin. For the preparation of 96 well plates, the cell suspension was diluted to 2.0×10^4 cells/ml. Plates were seeded with 200 μ L of suspension and incubated at 37 °C in a humidified 5 % CO₂ atmosphere. RA 27/3 strain (Meruvax II, Merck, Sharp and Dohme) and herpes simplex virus strain (Mc Intyre) stock virus were quantified by medium tissue—culture infections with 0.01 MOI (multiplicity of infection) on cell cultures. The confluent cell cultures were inoculated with a 100 μ L diluted virus in quadruplicates, for each cell line. After

1 h adsorption at room temperature, each well received 200 μ L of DMEM medium with 2 % FBS. Uninfected cultures were also prepared and treated identically as controls. Plate cultures were observed for CPE daily during 7 days, when the test was concluded. Fifty per cent infectivity end points were calculated by the method of Reed and Muench (1938). All titers are given as log 10 TCID₅₀ per 0.1 mL of virus.

Cytopathic effect (CPE) reduction assay

Vero and SIRC cells were seeded into 96 well plates at 2×10^4 cell per well and incubated during 48 h at 37 °C 5 % CO₂. The confluent cells were inoculated with 10 μ L of the purified hemolymph, an empty bacmid (clone 5) and the recombinant clones (rAVLO clone 10, rAVLO clone 16 and rAVLO clone 23) (Carmo et al. 2012), and incubated at 37 °C in a humidified 5 % CO₂ atmosphere. After 1 h, these cells were infected with viruses from the infected cultures, at dilutions rate of 10^{-1} – 10^{-7} for rubella virus and 10^{-5} – 10^{-12} for herpes virus.

Plaque formation was assessed after 5 days by staining with crystal violet after fixation of the cells with 3 % paraformaldehyde. The number of plates was counted manually. The PFU numbers were presented as average of duplicate samples. The experiment was repeated at least three times.

Quantitative real-time PCR assay

Total RNA was extracted from 200 μ L of each type culture infected and non infected using the MagNA Pure extractor (Roche, Basel, Switzerland). For rubella virus, RT-PCR was performed using Superscript III Step RT-PCR (Invitrogen), according to the manufacturer's recommendations. To amplify a 185-nucleotide region in the E1 coding region nucleotides 8,807–8,991 described by Abernathy et al. (2009). The assay was performed in triplicate with 25 μ L reactions mixtures containing reaction buffer (Invitrogen), 0.5 μ L of a Superscript-*Taq* enzyme mixture, 0.2 μ M of each primer, 0.1 μ M of the labeled probe (Invitrogen) and 5 μ L of RNA. This assay was carried out in triplicate for each sample, including a no-template control. The thermal cycling was carried out with an Applied Biosystems 7500 thermal cycle with 50 °C for 10 min; 95 °C for 2 min and 40 cycles

of 95 °C 15 s and 60 °C 1 min. The presence of intact RNA in the samples was confirmed with specific primers for RNaseP RNA (Emery et al. 2004). Four positive controls containing known copy numbers of transcribed RV RNA were run on each plate as quantitation standards. A reaction mixture containing water as the template was run on each plate as negative control. The data were analyzed with SDS software (version 2.1 AB). Herpes simplex virus quantitative real time PCR assay using primers described by Read and Kurtz (1999). For the real time PCR, the 20 µl solution containing 12 µl of the SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA USA), 10 µM of each primer, 6.5 µl H₂O, and 5 µl cDNA. Cycling conditions were as follows: 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 57 °C for 20 s and 72 °C for 40 s.

Bioinformatics

Sequence

The cDNA nucleic acid and respective amino acid sequence of the antiviral activity protein were obtained from Genbank (Access number: JN807330). The antiviral activity and sequence were described in previous published works (Carmo et al. 2012; Greco et al. 2009). All sequence editions were performed in Bioedit[®].

Sequence similarity search

The cDNA and amino acid sequences were submitted to BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool) in order to identify regions with similarity with sequences already described in the literature.

Structural predictions

In first instance, to determine if this sequence could be related to intrinsically unstructured type of proteins, we used the Intrinsically Unstructured Predictor Server (IUPRED). This technique estimates pairwise energy from amino acid composition and classifies between folded and disordered proteins. Three types of prediction can be performed: long disorder, short disorder and structured regions for the query sequence and for a protein which is known to have determined structured and disordered regions (Hepatitis C virus

Non-structured 5A region, Genbank access number: NC004102). IUPRED can be accessed at <http://iupred.enzim.hu/> (Dosztanyi et al. 2005).

Prediction of secondary structure types (helix, sheet and coil) was performed using different approaches, disponible at Phyre and PredictProtein platforms. Posttranslational modifications sites were performed using Prosite, on PredictProtein server. Phyre is disponible at <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/> (Kelley and Sternberg 2009). PredictProtein is available at <https://www.predictprotein.org> (Rost et al. 2004).

To verify the difficulty to get the structure of this protein experimentally, using protein crystallography, the sequence was submitted to XtalPred. This server predicts protein crystallizability analyzing several features of the protein. After computing these features, the program returns the results as an overall probability of crystallization. XtalPred is available at <http://ffas.burnham.org/XtalPred-cgi/xtal.pl> (Slabinski et al. 2007).

Protein signature, signal peptide and localization search

We used the InterProScan Sequence Search tool from EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) to recognize in the sequence different protein signatures databases. InterProScan combines several methods with further refinement procedures and it is widely used for structural and functional classification (Hunter et al. 2012).

SignalP 4.0 Server was used to predict presence and localization of signal peptide cleavage sites. This method is based on a combination of several artificial neural networks (ANN) and is considered one of the best methods to search for signal peptides (Petersen et al. 2011).

In combination with SignalP, TargetP server predicts subcellular localization for eukaryotic proteins. The local assignment is based on the predicted presence of aminoterminal presequences (Emanuelsson et al. 2007). SignalP and TargetP are available at Center for Biological Sequences (CBS) website: <http://www.cbs.dtu.dk/services/>.

Physical and chemical properties prediction

Overall weight, pI (Isoelectric point) and GRAVY (Grand Average of Hydropathicity) were estimated by

ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>). Protscale prediction server (<http://web.expasy.org/protscale/>) analyzed the sequence in order to predict several physical and chemical properties by different methods. Amino acid sequence was submitted in all available scales for polarity, hydrophobicity, accessibility and mutability in each residue position.

Proteasome processing, MHC binding and epitope predictions

To predict if in vivo this protein could have regions interacting with MHC NetCLT (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/>) database was used to identify in the sequence peptide motifs that could bind. The method integrates prediction of peptide MHC class I binding, proteasomal C terminal cleavage and TAP transport efficiency. The server allows for predictions of CTL epitopes restricted to 12 MHC class I supertype. MHC class I binding and proteasomal cleavage prediction is performed using artificial neural networks. TAP transport efficiency is predicted using weight matrix (Larsen et al. 2007). Only scores >0.75 (which means sensitivity of 0.8 and specificity of 0.94) were considered.

Statistics analysis

To verify if the differences between the prediction results were significant ($p < 0.05$), values were submitted to two-proportions test (Fisher's exact test) using the software MiniTab® (Minitab Inc., State College, PA, USA).

Results

Analytical procedures

The hemolymph in concentrations lower than 2 % (v/v) were not toxic to VERO and SIRC cells, since high percentages of viable cells were observed throughout the triplicates for cytotoxicity determination experiments.

The antiviral activity of the total hemolymph and recombinant clones were tested with rubella and herpes simplex viruses. Clones 5, 10, 16 and 23 were added to infected SIRC and VERO cells cultures 1 h prior the infection. The cells pre-treated with recombinant 10 and 23 showed a 1.000.000× decrease in

herpes virus titers in comparison to those in the control culture (cells without any treatment). Experiments carried out with the rubella virus showed similar results: the use of clone 16 caused a 10.0009 decrease in rubella virus titers. In summary, results from CPE reduction assay demonstrated that total hemolymph exhibited antiviral effects when it was added in pre-, post-infection and even simultaneously with the virus. The inhibitory effects of the total hemolymph were more powerful than when recombinants were tested. To identify any inhibitory effect of hemolymph on rubella and herpes replication, the viral genomic synthesis of rubella and herpes was compared between hemolymph treated and untreated infected cells. Total RNA and DNA extraction was performed after 96 h of rubella and herpes infection, and the intracellular viral load for both viruses were measured. Standard curves for the amplification were generated by a serial tenfold dilution of the template to evaluate the efficiencies of both reactions. The resulting standard curves showed that the amplification efficiencies for the genes were between 95 and 100 % with correlation coefficients greater than 0.99. The results of the qPCR showed a significantly increase in level of rubella and herpes transcription in the inoculated cells at 4 days after viral infection compared to the mock. Also, a reduction of rubella virus was observed in cells treated with rAVLO clone 16 and total hemolymph in dilutions of 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} (Fig. 1). Reduction of the herpes virus replication was observed in cells treated with recombinants 10, 16 and 23 in dilutions of 10^{-10} , 10^{-11} and 10^{-12} . In addition, total hemolymph completely inhibited the replication of herpes virus (Fig. 2).

Bioinformatics

Sequence similarity search

BLAST analysis of the cDNA sequence without the Histidine tail and TEV (tobacco etch virus) protease site (534 nucleic acids residues) resulted in identification of no sequence with similarity in Genbank. Respective protein sequence analysis, 178 amino acid residues, identified a low similarity region (41 %) with carnitine acetyl transferase (access numbers in Genbank: EGC43300.1; EEH08271.1; EER39656.1). The coverage of this region is from residues 97 until 138 of the query protein with residues 552 through 597 of the

Fig. 1 Rubella virus transcription levels in cells treated with rAVLO clones and total hemolymph measured by real time PCR. Different virus concentrations were used (each bar)

Fig. 2 Herpes transcription levels in cells treated with rAVLO clones and total hemolymph measured by real time PCR. Cells were treated with rAVLO clones and total hemolymph

reference sequences. No amino acid sequence covering full query sequence was encountered.

Structure predictions

IUPRED analysis indicated that this 178 amino acid sequence has an overall folded conformation. Therefore, it shows globular form. In details, the program returned no identified long regions with high disorder tendency (DT), with all positions below 45 % of probability of DT. According to IUPRED, short disordered regions are possible between residues 79 and 81 and 176 and 178, disorder tendency was around 60 and 70 %, respectively. According to the two previous described predictions, IUPRED prediction for structured regions showed that all the protein

extension has tendency to show globular structure. The results of the protein with known regions of structure/disorder were according to the results from experiments: a structured part (position 1–191) and a disordered region (from 192 to 448).

In summary, the query amino acid sequence was predicted by PredictProtein server to have alpha–beta type of second structure general architecture. In overall, the protein composition was 37.08 % of helix, 29.21 % of sheet and 33.71 % of coil. The Phyre server, predicted the 2nd structure composition as 40 % of helix, 24.86 % of sheet and 35.14 % of coil. Statistical analysis demonstrated that the results from these two serves have no significant difference ($0.4 < p < 0.9$).

Along the protein sequence, helix structure type was identified in at least two portions in N-terminal regions, with high confidence (>60 %): one between residues 01 and 15 and other between 79 and 95. In contrast, helix and coil structure types were identified distributed overall the sequence and did not comprehend as long portions as helix (maximum of 8 residues). Prosite analysis indicated phosphorylation and myristoylation modification sites. A summary of these predictions are shown in Fig. 3.

The prediction of the difficulty to obtain crystallography structure (XtalPred) from this protein, classified it as a sequence of median difficulty.

Protein signature, signal peptide and cell localization search

InterProScan identified only one known signature in amino acid sequence: a eukaryotic signal peptide at aminoterminal portion. In accordance, SignalP prediction showed more details of this sequence. The site with maximum cleavage probability is between residues 16 and 17 (99 % probability) at hydrogen-region.

Considering this result, TargetP predicted that this protein is secreted, with a pre-sequence length of 16 residues and reliability class of 2. Reliability classes are divided from 1 to 5, where 1 indicates the strongest prediction. RC is a measure of the size of the difference ('diff') between the highest (winning) and the second highest output scores. Class 2 indicates that $0.800 > \text{diff} > 0.600$.

Physical and chemical properties prediction

Overall protein molecular weight prediction resulted in 19.792 kDa. After cleavage, predicted by TargetP,

there should be two resulting fragments of 1.734 and 18.075 kDa. Theoretical pI and GRAVY also changed in overall sequence and on predicted fragments: pI = 5.98 and GRAVY = -0.094 before cleavage; pI = 7.98 and GRAVY = 2.05 for the small fragment; pI = 4.99 and GRAVY = -0.306 for the long fragment. Prediction of polarity and hydrophobicity by position (ProtScale) indicates that this protein shows an aminoterminal which is highly hydrophobic/nonpolar (until near residue 20). After this fragment, the sequence alternates from polar to nonpolar regions of around 15 residues of length, until residue 152. The following carboxi terminus shows a slightly increase in hydrophobicity. The most polar/hydrophilic region is located between residues 70 and 120 (Figs. 4, 5). According to these results, prediction of accessible or buried residues shows a right probability of the most hydrophilic region to be exposed in the overall structure (Fig. 6).

Fig. 4 Hydrophilic/polar prediction along the protein using Gratham and Zimmerman calculation methodologies. Higher values in both methods indicates higher hydrophilic/polar regions

Fig. 3 Second structure and posttranslational modifications sites predictions diagram in protein sequence. Each bar colored represents a second structure type and spaces represents coil/unstructured regions. Colored lines represents different sites predicted by Prosite. (Color figure online)

Fig. 5 Hydrophobic prediction along the protein using different methods. Higher values indicate higher hydrophobic regions in Miyasawa, OMH Sweet, Rao and Argos, Rose, Roseman and

Tanford methods; the opposite occurs in Bull and Breese, Guy and Hopp and Wodds predictions. *X-axis* residue position, *Y-axis* score calculated

Fig. 6 Protscale predictions for mutability, antigenicity and accessibility of each residue in the protein sequence

The relative mutability analysis shows that in the first 10 residues, around residues 30–35 and 105–110; the mutability is lowest. On other hand, from residues 17 to 20, 70 to 90 and following residue 120; the highest values of mutability is shown (Fig. 6).

MHC binding sites and epitope predictions

NetCLT predict 49 potential epitopes in the protein sequence. The epitopes predictions concentrated in two regions: on the aminoterminal (residue 1–40) and on the central region (60–120). A schematic picture summarizing this prediction was built (Fig. 7).

Discussion

The expansion of number and the application of antiviral drugs is remarkable, mainly in the last decade. Examples from the current repertoire of new antiviral drugs are anti-HIV, anti-CMV, anti-HSV, anti-VZV, anti-RSV, anti-hepatitis viruses and anti-influenza viruses (De Clercq 2001). Development of new antivirals is a subject of recent expansion, thus there is still plenty of improvement needed (De Clercq 2002). In this field, the bioinformatics tools play an essential role. The combination of fast, reliable and wide range application of software analysis is an important advantage of these tools to help in new drugs investigations (Butte and Ito 2012; Wishart 2005).

Herpes simplex virus (HSV) is a very common human pathogenic virus. Clinically, HSV infection may give rise to gingivostomatitis, cold sore, keratitis, encephalitis, and genital herpes. HSV-1 and HSV-2 use several glycoprotein receptor complexes when they enter into the host cells. Both genotypes

express the glycoproteins gB, gC, gD, gE and gL. All except gC are essential for viral entry, although the absence of gC does reduce efficiency. gC makes the first contact with the host cell, binding to heparin sulfate (HS) proteoglycans on the cell surface (Bernard et al. 2007). The herpes simplex virus can enter cells by two pathways: fusion of the envelope with the plasma membrane and by endocytosis. The first one is dependent on the interaction with specific receptors on the cell surface. The second is an auxiliary pathway which involves endocytosis of the envelope capsid and receptor-dependent fusion of the envelope with the membrane of the endocytic vesicle. Both pathways require initially, reversible attachment to the cell surface (Bernard et al. 2007). This first step in entry involves the binding of virion gC and gB proteins to cell-surface glycosaminoglycans (GAG). The importance of this step can be demonstrated by observation that enzymatic removal of GAGs results in 10–20 fold decrease in efficiency of plaque formation. In this study, we found that hemolymph exhibits selective inhibitory effect against HSV-1. Four probable pathways might be deduced to their antiviral effects: (Abernathy et al. 2009) blockage of viral binding to the cell receptors; (O'Neill et al. 2003) attenuation of viral replication after entry; (Emery et al. 2004) inhibition of virus release from host cells and (Read and Kurtz 1999) reduction of the inflammatory cytokines “storm” induced by the virus infection. Our results showed the antiviral effects with pre-incubation treatment presented CPE reduction assay with higher inhibitory activity than the simultaneous treatment for recombinant or total hemolymph. Moreover, to corroborate the antiviral activity, a qPCR assay was used to test the in vitro effect of the hemolymph on viral

Fig. 7 Epitope prediction results using NetCLT results. The number indicates the first amino acid position of the epitope. Each color represents one MHC allele which binds to the region.

Multicolor bars indicate epitopes recognized by more than one allele. (Color figure online)

replication (Fig. 2). Olicard et al. (2005) showed that the addition of the hemolymph of *C. gigas* to Vero cell cultures prior to infection with HSV-1 did not affect subsequent infection. Thus, the inhibitory action of the hemolymph on viral replication may be through the activation the IFN pathways. Recently, Melchjorsen et al. (2009) showed the initial response of the cells infected by HSV is secretion of antiviral substances, such as defensins and nitric oxid and, most importantly, the production of cytokines, including IFNs and chemokines. The type I IFNs (IFN- $\alpha\beta$) are key cytokines produced during the very first hours after HSV infection. In vivo studies show that IFN- $\alpha\beta$ alone controls early HSV infection independently of natural killer (NK) cells and lymphocyte activity (Bernard et al. 2007). Therefore, although studies have established an important role for IFN- $\alpha\beta$ in antiviral defense, it is difficult to determine whether IFN- $\alpha\beta$ contribution to viral clearance is primarily mediated by direct antiviral mechanism or by indirect immunoregulatory mechanisms. In addition, IFN λ induces an antiviral state in cells through the Janus kinase-signal transducers and activators of transcription-, the JAK/STAT pathway (Kotenko 2011; Sheppard et al. 2003). During early HSV infection, activation of multiple cellular transcription factors such as NF- κ B, MAPK and IRF is also coordinated (Melchjorsen et al. 2009). Although some therapeutic and diagnostic improvements for control of HSV have been developed during the last years, the virus is by no means under control. The outcome of HSV infections is dependent on the balance between virus propagation and an effective immune response. Appropriate expression of IFNs, cytokines and chemokines is essential for efficient host defense against infection. Maybe, the mechanism of hemolymph includes induction of IFN $\alpha\beta$ expression. Currently, we are studying this suggested hypothesis.

Rubella is classified in the *Togaviridae* family. The virus contains a single-stranded RNA genome and it is the only member of a separate genus called *Rubivirus*. The virus particle has a diameter of about 60 nm. There is a nucleocapsid exhibiting cubic symmetry surrounded by a lipoprotein envelope with projections consisting of two glycoproteins (E1 and E2). The high GC content, up to 65 %, is the most distinguished characteristic of the viral genome (Hobman and Chantler 2007).

Rubella virus infected cells have a reduced life span. Consequently, in the organs of affected fetuses and infants the number of cells is lower than in healthy ones. Rubella can also induce damage by apoptosis. In vitro studies suggest that this effect is due to a rubella-induced caspase-dependent mechanism. Details of this mechanism are still unclear, but it seems to be dependent on virus replication started within 12 h of infection. The p53 pathway seems not be involved. However, in non-human cells, although viral replication is required to induce apoptosis, it is the non-infected neighboring cells that undergo this effect. In addition, the IFN α and γ restrict viral replication, reducing the levels of viral RNA in the cell and inhibiting viral translation. Interestingly, Stanwick and Hallum (1974) found that other cells persistently infected with RUBV [BSC1, BHK (hamster; these cells lack the type I IFN receptor), RK13 (rabbit), and HeLa (human)] were not cured by similar levels of exogenously IFN administration. In conclusion, RUBV persistent infection in cell culture is surprisingly resistant to IFN treatment, likely contributing to the ability of RUBV to establish a persistent infection. Rubella transcription level was also affected by the presence of total hemolymph and rAVLO clones (Fig. 1).

Based on the advantages of in silico tools, the present study proposed the use of bioinformatics available softwares to describe a novel protein which showed antiviral activity. These analyses showed many interesting characteristics of this protein. This protein shows a signal peptide for secretion, which is cleaved. This result is agreeing with the previous experimental analysis that showed this protein as a hemolymph component (Greco et al. 2009). Hemolymph products from different arthropods are potential candidates to treat different diseases in the human body. Promising anticancer agents (Wu et al. 2009), antithrombotic (Guerrero et al. 2011) and antimicrobial agents (Gazit et al. 1994; Slocinska et al. 2008) are some examples.

Overall hydrophobicity analysis showed that this protein is hydrophilic (GRAVY = -0.306) with predominantly folded regions. Folding is essential to define a stable conformation of the peptide (Potluri et al. 2004). Therefore, in summary, bioinformatics analysis indicated that these physical and chemical properties of the protein may be stable enough to allow successful experimental analysis of structure and interaction.

Furthermore, Prosite search recognized potential posttranslational modifications sites (Fig. 3). Potential phosphorylation sites were identified in 11 positions. Addition of phosphorus atoms in the protein leads to a reversible modification in protein structure. It is a mechanism used in cell signaling and regulatory pathways (Olsen et al. 2006). Myristoylation sites were found in two positions of the protein. Covalent myristate binding is not reversible and alters the protein hydrophobicity, which is important to the structural maintenance of the macromolecule (Gordon et al. 1991).

Moreover, in silico results pointed to a candidate region for interacting with cell/virus (Fig. 6). Accessibility, polarity and MHC binding pointed to a highly exposed region between residues 70 and 120. Although experimental analyses are still needed for confirmation, this region could interact with virus or cellular proteins inhibiting the establishment of viral infection, primarily at an early stage during the infection.

Summarizing our study, the CPE assay results showed reduction in the replication of the viruses. In addition, qPCR results indicate that there was a small inhibition, unlike what occurred in Vero cells inoculated with herpes. Bioinformatics analysis indicated interesting results. The protein seems to present folding and hydrophilic profiles compatible to future crystallography essays (Figs. 4, 5). A possible region of interaction with cellular and/or viral proteins was also identified (Fig. 7).

It was concluded that the novel protein from hemolymph may act as a potent antiviral agent at different virus types: enveloped viruses (rubella virus, herpes virus, and measles virus), non-enveloped viruses (picornavirus), genomic DNA viruses (herpes virus) and RNA viruses (influenza virus, measles virus and picornavirus) (Carmo et al. 2012; Greco et al. 2009). Further analyses to understand its mechanism of action and applicability in vivo are essential. However, with the previous and present results, we can conclude that this macromolecule has the potential to become a promising antiviral agent with broad spectrum activity.

References

- Abernathy E, Cabezas C, Sun H, Zheng Q, Chen MH, Castillo-Solorzano C, Ortiz AC, Osorio F, Oliveira L, Whitembury A, Andrus JK, Helfand RF, Icenogle J (2009) Confirmation of rubella within 4 days of rash onset: comparison of rubella virus RNA detection in oral fluid with immunoglobulin M detection in serum or oral fluid. *J Clin Microbiol* 47:182–188. doi:10.1128/JCM.01231-08
- Bernard R, David K, Richard W (2007) Herpes virus. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields virology*, vol 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 2502–2601
- Butte AJ, Ito S (2012) Translational bioinformatics: data-driven drug discovery and development. *Clin Pharmacol Ther* 91:949–952. doi:10.1038/clpt.2012.55
- Carmo AC, Giovanni DN, Corrêa TP, Martins LM, Stocco RC, Suazo CA, Moraes RH, Veiga AB, Mendonça RZ (2012) Expression of an antiviral protein from *Lononia obliqua* hemolymph in baculovirus/insect cell system. *Antiviral Res* 94:126–130. doi:10.1016/j.antiviral.2011.12.010
- Chernysh S, Kim SI, Bekker G, Pleskach VA, Filatova NA, Anikin VB, Platonov VG, Bulet P (2002) Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12628–12632
- Cueto AP, Alves SH, Pilau M, Weiblen R, Kubiça TF, Lovato LT (2011) Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. *Ciência Rural* 41:1800–1806
- De Clercq E (2001) Antiviral drugs: current state of the art. *J Clin Virol* 22:73–89
- De Clercq E (2002) Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov* 1:13–25. doi:10.1038/nrd703
- Delcroix M, Riley LW (2011) Cell-penetrating peptides for antiviral drug development pharmaceuticals. 3:448–470
- Dosztanyi Z, Csizmek V, Tompa P, Simon I (2005) The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins. *J Mol Biol* 347:827–839. doi:10.1016/j.jmb.2005.01.071
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* 2:953–971. doi:10.1038/nprot.2007.131
- Emery SL, Erdman DD, Bowen MD, Newton BR, Winchell JM, Meyer RF, Tong S, Cook BT, Holloway BP, McCaustland KA, Rota PA, Bankamp B, Lowe LE, Ksiazek TG, Bellini WJ, Anderson LJ (2004) Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. *Emerg Infect Dis* 10:311–316
- Fiore AE, Fry A, Shay D, Gubareva L, Bresee JS, Uyeki TM (2011) Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza—recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 60:1–24
- Gazit E, Lee WJ, Brey PT, Shai Y (1994) Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study. *Biochemistry* 33:10681–10692
- Gordon JI, Duronio RJ, Rudnick DA, Adams SP, Gokel GW (1991) Protein N-myristoylation. *J Biol Chem* 266:8647–8650
- Greco KN, Mendonça RM, Moraes RH, Mancini DA, Mendonça RZ (2009) Antiviral activity of the hemolymph of *Lononia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). *Antiviral Res* 84:84–90. doi:10.1016/j.antiviral.2009.07.018
- Guerrero B, Arocha-Pinango CL, Salazar AM, Gil A, Sanchez EE, Rodriguez-Acosta A, Lucena S (2011) The effects of

- Lonomin V, a toxin from the caterpillar (*Lonomia ache-lous*), on hemostasis parameters as measured by platelet function. *Toxicon Off J Int Soc Toxinol* 58:293–303. doi:[10.1016/j.toxicon.2011.07.003](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.07.003)
- Heinen TE, da Veiga AB (2011) Arthropod venoms and cancer. *Toxicon* 57:497–511. doi:[10.1016/j.toxicon.2011.01.002](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.01.002)
- Hobman T, Chantler J (2007) Rubella virus. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields virology*, vol 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 1069–1100
- Hunter S, Jones P, Mitchell A, Apweiler R, Attwood TK, Bateman A, Bernard T, Binns D, Bork P, Burge S, de Castro E, Coggill P, Corbett M, Das U, Daugherty L, Duquenne L, Finn RD, Fraser M, Gough J, Haft D, Hulo N, Kahn D, Kelly E, Letunic I, Lonsdale D, Lopez R, Madera M, Maslen J, McAnulla C, McDowall J, McMenamin C, Mi H, Mutowo-Muellenet P, Mulder N, Natale D, Orengo C, Pesceat S, Punta M, Quinn AF, Rivoire C, Sangrador-Vegas A, Selengut JD, Sigrist CJ, Scheremetjew M, Tate J, Thimmajananathan M, Thomas PD, Wu CH, Yeats C, Yong SY (2012) InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Res* 40:D306–D312. doi:[10.1093/nar/gkr948](https://doi.org/10.1093/nar/gkr948)
- Kao RY, Yang D, Lau LS, Tsui WH, Hu L, Dai J, Chan MP, Chan CM, Wang P, Zheng BJ, Sun J, Huang JD, Madar J, Chen G, Chen H, Guan Y, Yuen KY (2010) Identification of influenza A nucleoprotein as an antiviral target. *Nat Biotechnol* 28:600–605. doi:[10.1038/nbt.1638](https://doi.org/10.1038/nbt.1638)
- Kelley LA, Sternberg MJ (2009) Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 4:363–371. doi:[10.1038/nprot.2009.2](https://doi.org/10.1038/nprot.2009.2)
- Kotenko SV (2011) IFN-lambdas. *Curr Opin Immunol* 23:583–590. doi:[10.1016/j.coi.2011.07.007](https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.07.007)
- Larsen MV, Lundegaard C, Lamberth K, Buus S, Lund O, Nielsen M (2007) Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. *BMC Bioinform* 8:424. doi:[10.1186/1471-2105-8-424](https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-424)
- Lohner K, Staudegger E (2001) Are we on the threshold of the post-antibiotic era? In: Lohner K (ed) *Development of novel antimicrobial agents: emerging strategies*. Horizon Scientific Press, England
- Melchjorsen J, Matikainen S, Paludan SR (2009) Activation and evasion of innate antiviral immunity by herpes simplex virus. *Viruses* 1:737–759. doi:[10.3390/v1030737viruses-01-00737](https://doi.org/10.3390/v1030737viruses-01-00737)
- Olicard C, Renault T, Torhy C, Benmansour A, Bourgougnon N (2005) Putative antiviral activity in hemolymph from adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Antiviral Res* 66:147–152
- Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127:635–648. doi:[10.1016/j.cell.2006.09.026](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.026)
- O'Neill HJ, Wyatt DE, Coyle PV, McCaughy C, Mitchell F (2003) Real-time nested multiplex PCR for the detection of herpes simplex virus types 1 and 2 and varicella zoster virus. *J Med Virol* 71:557–560. doi:[10.1002/jmv.10516](https://doi.org/10.1002/jmv.10516)
- Ourth DD (2004) Antiviral activity against human immunodeficiency virus-1 in vitro by myristoylated-peptide from *Heliothis virescens*. *Biochem Biophys Res Commun* 320:190–196
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785–786. doi:[10.1038/nmeth.1701](https://doi.org/10.1038/nmeth.1701)
- Popham HJ, Shelby KS, Brandt SL, Coudron TA (2004) Potent virucidal activity in larval *Heliothis virescens* plasma against *Helicoverpa zea* single capsid nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol* 85:2255–2261
- Potluri S, Khan AA, Kuzminykh A, Bujnicki JM, Friedman AM, Bailey-Kellogg C (2004) Geometric analysis of cross-linkability for protein fold discrimination. *Pac Symp Biocomput* 447–458
- Read SJ, Kurtz JB (1999) Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR screening assay. *J Clin Microbiol* 37:1352–1355
- Reed LJ, Muench H (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol* 27:493–497
- Rost B, Yachdav G, Liu J (2004) The predictprotein server. *Nucleic Acids Res* 32:W321–W326. doi:[10.1093/nar/gkh37732/suppl_2/W321](https://doi.org/10.1093/nar/gkh37732/suppl_2/W321)
- Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrander C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM (2003) IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 4:63–68. doi:[10.1038/ni873ni873](https://doi.org/10.1038/ni873ni873)
- Slabinski L, Jaroszewski L, Rychlewski L, Wilson IA, Lesley SA, Godzik A (2007) XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics* 23:3403–3405. doi:[10.1093/bioinformatics/btm477](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm477)
- Slocinska M, Marciniak P, Rosinski G (2008) Insects antiviral and anticancer peptides: new leads for the future? *Protein Pept Lett* 15:578–585
- Stanwick TL, Hallum JV (1974) Role of interferon in six cell lines persistently infected with rubella virus. *Infect Immun* 10:810–815
- Wishart DS (2005) Bioinformatics in drug development and assessment. *Drug Metabol Rev* 37:279–310. doi:[10.1081/DMR-55225](https://doi.org/10.1081/DMR-55225)
- Wu JM, Jan PS, Yu HC, Haung HY, Fang HJ, Chang YI, Cheng JW, Chen HM (2009) Structure and function of a custom anticancer peptide, CB1a. *Peptides* 30:839–848. doi:[10.1016/j.peptides.2009.02.004](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.02.004)
- Yao H, Wu X, Gokulamma K (2006) Antiviral activity in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. *J Zhejiang Univ Sci A* 7:350–356. doi:[10.1631/jzus.2006.AS0350](https://doi.org/10.1631/jzus.2006.AS0350)

APÊNDICE C – Outras publicações

Publicado online (em publicação):

ARALDI, R. P.; **GIOVANNI D. N. S.**; MELO, T. C.; DINIZ, N.; MAZZUCHELLI-DE-SOUZA, J.; SANT'ANA, T. A.; CARVALHO, R. F.; BEÇAK, W.; STOCCO, R. C.. Bovine Papillomavirus Isolation By Ultracentrifugation. J. Virol. Methods., 2014.

Aceito para publicação, em correções:

ONOFRIO, V. C.; RAMIREZ, D. G.; **GIOVANNI, D. N. S.**; MARCILI, A.; MANGOLD, A. J.; VENZAL, J. M. ; MENDONÇA, R. Z.; LABRUNA, M. B.; BARROS-BATTESTI, D. M. Validation of the taxon *Ixodes aragaoi* Fonseca (Acari: Ixodidae) based on morphological and molecular data. Zootaxa

ANEXO A - Frequência de códons em *E. Coli*

Escherichia coli B [gbbct]: 11 Sequências codificadoras (CDS)'s (3771 códons)

aa	Códon	Quantidade	/1000	aa	Códon	Quantidade	/1000
Gly	GGG	54.00	14.32	Trp	TGG	48.00	12.73
Gly	GGA	31.00	8.22	End	TGA	3.00	0.80
Gly	GGT	92.00	24.40	Cys	TGT	16.00	4.24
Gly	GGC	125.00	33.15	Cys	TGC	22.00	5.83
Glu	GAG	68.00	18.03	End	TAG	1.00	0.27
Glu	GAA	111.00	29.44	End	TAA	7.00	1.86
Asp	GAT	113.00	29.97	Tyr	TAT	70.00	18.56
Asp	GAC	57.00	15.12	Tyr	TAC	32.00	8.49
Val	GTG	128.00	33.94	Leu	TTG	70.00	18.56
Val	GTA	40.00	10.61	Leu	TTA	66.00	17.50
Val	GTT	74.00	19.62	Phe	TTT	109.00	28.90
Val	GTC	54.00	14.32	Phe	TTC	71.00	18.83
Ala	GCG	123.00	32.62	Ser	TCG	43.00	11.40
Ala	GCA	74.00	19.62	Ser	TCA	23.00	6.10
Ala	GCT	52.00	13.79	Ser	TCT	32.00	8.49
Ala	GCC	96.00	25.46	Ser	TCC	30.00	7.96
Arg	AGG	8.00	2.12	Arg	CGG	19.00	5.04
Arg	AGA	9.00	2.39	Arg	CGA	9.00	2.39
Ser	AGT	34.00	9.02	Arg	CGT	62.00	16.44
Ser	AGC	54.00	14.32	Arg	CGC	71.00	18.83
Lys	AAG	33.00	8.75	Gln	CAG	93.00	24.66
Lys	AAA	110.00	29.17	Gln	CAA	51.00	13.52
Asn	AAT	80.00	21.21	His	CAT	35.00	9.28
Asn	AAC	60.00	15.91	His	CAC	27.00	7.16
Met	ATG	141.00	37.39	Leu	CTG	207.00	54.89
Ile	ATA	19.00	5.04	Leu	CTA	13.00	3.45
Ile	ATT	128.00	33.94	Leu	CTT	48.00	12.73
Ile	ATC	117.00	31.03	Leu	CTC	53.00	14.05
Thr	ACG	55.00	14.58	Pro	CCG	94.00	24.93
Thr	ACA	23.00	6.10	Pro	CCA	28.00	7.43
Thr	ACT	29.00	7.69	Pro	CCT	22.00	5.83
Thr	ACC	95.00	25.19	Pro	CCC	9.00	2.39

Coding GC 51.06% 1st letter GC 56.56% 2nd letter GC 39.38% 3rd letter GC 57.23%

ANEXO B - Lista de abreviatura de aminoácidos em 3 e 1 letras e seus respectivos códons de RNA mensageiros

Abreviatura (3 letras)	Abreviatura (1letra)	Aminoácido	Códons RNA mensageiros
Asp	D	Ac. Aspártico	GAC GAU
Glu	E	Ac. Glutâmico	GAA GAG
Arg	R	Arginina	CGA CGC CGG CGU AGA AGG
Lys	K	Lisina	AAA AAG
Asn	N	Asparagina	AAC AAU
His	H	Histidina	CAC CAU
Gln	Q	Glutamina	CAA CAG
Ser	S	Serina	UCA UCC UCG UCU AGC AGU
Thr	T	Treonina	ACA ACC ACG ACU
Ala	A	Alanina	GCA GCC GCG GCU
Gly	G	Glicina	GGA GGC GGG GGU
Val	V	Valina	GUA GUC GUG GUU
Pro	P	Prolina	CCA CCC CCG CCU
Leu	L	Leucina	CUA CUC CUG CUU UUA UUG
Phe	F	Fenilalanina	UUC UUU
Tyr	Y	Tirosina	UAC UAU
Ile	I	Isoleucina	AUA AUC AUU
Met	M	Metionina	AUG
Trp	W	Triptofano	UGG
Cys	C	Cisteína	UGC UGU
		Parada	UAA UAG UGA

Fonte: Adaptado de (LEHNINGER et al., 2005).

ANEXO C - Purificação de dna em gel de agarose kit minelute® gel extraction Qiagen®

Procedimento:

1. Recortar o fragmento de DNA do gel de agarose com uma lâmina de bisturi;
 2. Pesar o fragmento de gel num tubo incolor. Adicionar 3 volumes de tampão QG para um volume de gel (1 mg de gel / 3 µl de tampão QG).
 3. Incubar no termobloco sob agitação a 50 ° C durante 10 minutos (ou até que o pedaço tenha dissolvido completamente);
- PS: Após dissolução verificar que a cor da mistura é amarela (semelhante do tampão QG). Se a cor da mistura for cor de laranja ou violeta, adicionar 10 µl de acetato de sódio 3 M, pH 5,0, homogeneizar no vortex para volta a cor amarela.
4. Adicionar um volume de gel de isopropanol à amostra e homogeneizar no vortex (1 mg de Gel / 1 µl de Isopropanol).
 5. Montar a coluna de spin MinElute no tubo coletor;
 6. Aplicar 800 µl da amostra na coluna MinElute e centrifugar durante 1 minuto a 10,000 x g, descartar o filtrado e recolocar a coluna MinElute no mesmo tubo. Para amostras com volumes maiores de 800 µl, repetir o passo.
 8. Adicionar 500 µl de tampão QG à coluna MinElute e centrifugar a 10,000 x g durante 1 minuto. Descartar o filtrado e recolocar a coluna MinElute no mesmo tubo.
 9. Adicionar 750 µl de tampão de lavagem PE a coluna MinElute, incubar por 5 minutos e centrifugar durante 1 minuto a 10,000 x g. Descartar o filtrado e recolocar a coluna MinElute no mesmo tubo.
 10. Para retirada de resíduos, centrifugar a coluna MinElute vazia por 2 minutos a 10.000 x g.
 11. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna MinElute para um microtubo de 1,5 µl estéril livre de DNA/RNase.
 12. Adicionar 10 µl de H₂O *MilliQ* estéril no centro da membrana da coluna MinElute, incubar por 5 min, e seguida centrifugar a coluna durante 1 minuto a 10,000 x g. Descartar a coluna e armazenar o filtrado em freezer -20 °C até o uso.

ANEXO D - Preparo de células competentes

Para o cultivo de *E. coli* foi utilizando o meio LB (Luria Broth) (SERVA), conforme as indicações do fabricante.

Para o preparo de células competentes, uma colônia foi inoculada em 10 ml de meio LB sem antibiótico e mantida *overnight* a 37 °C sob agitação de 200 rpm. Após este período, 250 µl deste cultivo foi diluído em 10 ml de meio LB sem antibiótico. Esta cultura foi incubada a 37 °C, sob agitação (200 rpm), em *shaker*, até a obtenção de DO 600 de aproximadamente 0,4. Quando este valor for alcançado, o cultivo deve ser incubado em gelo por 10 minutos.

O cultivo foi centrifugado por 5 minutos a 1077 g, 4 °C. O sobrenadante foi descartado por inversão e foram adicionados 2,4 ml de CaCl₂ 0,1 M gelado.

Após homogeneização leve, o material foi novamente centrifugado por 5 minutos a 1077 g, 4 °C. O sobrenadante foi descartado por inversão e o pellet ressuspendido em 480 µl de CaCl₂ 0,1 M gelado.