SÉRGIO FERNANDES

**PRODUÇÃO DE PROTEÍNA LOPAP RECOMBINANTE (PROTEASE
ATIVADORA DE PROTROMBINA DA LAGARTA *Lonomia obliqua*),
PURIFICAÇÃO, AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE E ESTUDOS
ESTRUTURAIS**

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

São Paulo
2014

SÉRGIO FERNANDES

**PRODUÇÃO DE PROTEÍNA LOPAP RECOMBINANTE (PROTEASE
ATIVADORA DE PROTROMBINA DA LAGARTA *Lonomia obliqua*),
PURIFICAÇÃO, AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE E ESTUDOS
ESTRUTURAIS**

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Marisa Chudzinski-Tavassi

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 total

Fernandes, Sérgio.

Produção de proteína LOPAP recombinante (protease ativadora de protrombina da lagarta *Lonomia obliqua*), purificação, avaliação de estabilidade e estudos estruturais / Sérgio Fernandes. – São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria Chudzinski Tavassi.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Produção de proteína recombinante. Purificação e caracterização de proteínas.

Versão do título para o inglês: Production of recombinant protein LOPAP (*Lonomia obliqua* caterpillar prothrombin activator protease), purification, stability evaluation and structural studies.

1. Hemostasia 2. Proteína recombinante 3. Purificação de proteínas
4. Análise e estrutura de proteínas I. Tavassi, Profa. Dra. Ana Maria Chudzinski II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0154/2014

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

Candidato(a): Sérgio Fernandes.

Título da Dissertação: Produção de proteína LOPAP recombinante (protease
ativadora de protrombina da lagarta *Lonomia obliqua*),
purificação, avaliação de estabilidade e estudos estruturais .

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Maria Chudzinski Tavassi.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. 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, 9 de outubro de 2013

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Produção de Lopap (*Lonania obliqua* prothrombin activator protease) recombinante, purificação, avaliação de estabilidade e estudos estruturais", protocolo nº. I-1147/13, sob a responsabilidade de Ana Marisa Chudzinski Tavassi e Sérgio Fernandes, não envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica.

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEEAIB

Dedico este trabalho a três pessoas especiais:

- *a meu pai, com quem aprendi a importância do trabalho e da honestidade,*
- *a minha mãe, com quem aprendi a sempre persistir,*
- *e a minha esposa, que faz minha vida completa todos os dias.*

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Ana Marisa Chudzinski Tavassi por ter permitido esta oportunidade, ter apoiado e se colocado sempre à disposição em todos os momentos, pela orientação e por todos os recursos dispendidos.

À Dr.^a Maria Filomena de Andrade Rodrigues, pelo seu apoio à execução do projeto dentro do IPT e indicação da orientação.

À Dr.^a Rosane Aparecida Moniz Piccoli, que orientou e ajudou nos ensaios de biorreator com muita dedicação e amizade.

À Dr.^a Linda Christian Carrijo Carvalho, por toda a orientação e paciência no início do projeto, e pela colaboração no ensaio de viabilidade celular, com ajuda da doutoranda Cicília de Carvalho.

Ao Dr. Leonardo Kobashi e Dr. Enéas de Carvalho, do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, pela ajuda com as análises de dicroísmo circular.

À Dr.^a Elisabeth de Fátima Pires Augusto por ter sido quem primeiro aventou a possibilidade do mestrado.

Aos técnicos do laboratório de biotecnologia do IPT, Antônio Fernando Montemor, Maria Alice Alves Wada, Régis Norberto Carvalho, Renato de Jesus Andrade e Valter de Oliveira, que ajudaram na montagem e monitoramento dos ensaios de biorreator e clarificação.

À doutoranda Roseli Salomoni pela ajuda no monitoramento de ensaio de biorreator e pelos diversos materiais cedidos.

À Dr.^a Patrícia Leo e doutoranda Claudia Arantes Montans Anacleto pelas células HUVEC cedidas.

À Dr.^a Juliana Mozer Sciani por sua enorme colaboração nas etapas de purificação.

Ao grupo do laboratório de bioquímica e biofísica do Instituto Butantan, pela receptividade, em especial à Dr.^a Kerly Pasqualoto, Dr.^a Fernanda Faria e Dr.^a Simone Michaela Simons, às técnicas Heleusa Sampaio Moura e Denise Ceravolo Verreschi, e a mestranda Vânia Goulart Branco.

Ao Laboratório de Biotecnologia Industrial do IPT- Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo e ao Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan por terem permitido utilizar suas infraestruturas laboratoriais para a execução deste trabalho.

RESUMO

FERNANDES, S. **Produção de proteína LOPAP recombinante (protease ativadora de protrombina da lagarta *Lonomia obliqua*), purificação, avaliação de estabilidade e estudos estruturais**. 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

LOPAP é uma proteína isolada do extrato de cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*. É um ativador de protrombina que demonstra atividade semelhante a uma serino protease, possui efeito pró-coagulante, também induz a secreção de citocinas e tem ação citoprotetora em células do endotélio humano, em cultivo. Estruturalmente, é uma proteína de cadeia única de 181 resíduos de aminoácidos e 21 kDa de massa molecular, entretanto um arranjo de estrutura quaternária de quatro proteínas formando um tetrâmero com 69 kDa já foi proposto. A estrutura terciária do LOPAP é um barril- β , formado por oito folhas- β que se fecham em uma extremidade e são mantidas juntas por pontes de hidrogênio. Esta estrutura característica e a presença de três regiões de domínios conservados na sua sequência primária possibilita ao LOPAP ser classificado como pertencente ao grupo das Lipocalinas, notavelmente um grupo de proteínas de transporte. Neste trabalho estudou-se a produção de LOPAP recombinante (rLOPAP) em cultura de levedura (*Pichia pastoris*) feita em biorreator de 10 L, utilizando um protocolo de produção previamente modificado, e a proteína obtida foi purificada e sua estabilidade avaliada pelas atividades enzimática e citoprotetora. Foi feito ainda uma produção de rLOPAP, na presença de um inibidor de N-glicosilação, sem nenhuma outra alteração nos protocolos seguidos de produção, purificação e avaliação de estabilidade. A caracterização da estrutura secundária das proteínas também foi realizada. A produção de rLOPAP foi feita com controle automático de pH, temperatura, aeração e agitação. Oxigênio dissolvido, massa seca e consumo de fonte de carbono também foram analisados. Uma fase de pré-inóculo foi feita durante 48 h em agitador rotativo, depois um inóculo de 10% do volume final do biorreator foi obtido, iniciando uma fase de batelada, seguida por uma fase de batelada alimentada. Ambas utilizaram glicerol como fonte de carbono, atingindo o tempo total de 120 h de cultura, para crescimento de biomassa (atingiu 160 g/L) e produção de rLOPAP, excretada no caldo de fermentação. Posteriormente, centrifugação e filtração foram feitas e a biomassa foi descartada. O sobrenadante passou por duas etapas de purificação cromatográfica, uma troca iônica e depois uma etapa de exclusão por tamanho, ambas intercaladas por concentração por centrifugação ou por filtração tangencial usando membranas seletivas de tamanho molecular. Conteúdo total de proteínas, SDS-PAGE, atividade enzimática (ensaio de ativação de protrombina), efeito em viabilidade celular e dicroísmo circular (CD) foram avaliados no material final purificado. Não se observou diferença nos perfis de migração de bandas no SDS-PAGE correspondentes ao rLOPAP, das culturas com ou sem inibidor de glicosilação, indicando que provavelmente esta proteína não é expressa com N-glicosilações. O melhor resultado atingido no processo em relação à concentração de proteína foi 0,714 mg/L e a atividade ativadora de protrombina esperada não foi obtida. Entretanto, foi observado um efeito citoprotetor em HUVEC (células do endotélio de cordão umbilical humano) em cultivo. Considerando estes resultados, a proteína foi expressa pela levedura *Pichia* com tamanho e sequência corretos, mas o rLOPAP

não foi expresso com a correta estrutura secundária, o que é determinante para a atividade enzimática. Isto é apoiado pelos resultados de CD obtidos, que mostram um perfil muito diferente comparando ao da assinatura do grupo das lipocalinas, uma estrutura secundária predita com predominância esperada das folhas- β , sobre as α -hélices e seguimentos aleatórios.

Palavras-chave: *Lonomia obliqua*. LOPAP. Ativador de protrombina. Efeito pró-coagulante. Atividade citoprotetora. Lipocalina. Produção de proteína recombinante. *Pichia pastoris*.

ABSTRACT

FERNANDES, S. **Production of recombinant protein LOPAP (*Lonomia obliqua* caterpillar Prothrombin Activator Protease), purification, stability evaluation and structural studies.** 2014. 89 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

LOPAP is a protein isolated from the bristles' extract of *Lonomia obliqua* caterpillar. It is a prothrombin activator which shows serine protease-like activity, has procoagulant effect, and also has induced cytokine secretion and antiapoptotic pathways in human cultured endothelial cells. Structurally, it is a single chain protein of 181 amino acid residues and 21 kDa of molecular mass, however a quaternary structure arrangement of four proteins building up a tetramer with nearly 69 kDa had already been proposed. The tertiary structure of LOPAP is a β -barrel made by eight β -sheets that close at one end and are fit together by hydrogen bonds. This characteristic structure and the presence of three conserved domain regions on its primary sequence enabled LOPAP to be classified as belonging to the Lipocalin group, remarkably a group of proteins of transport. In this work it was studied the production of recombinant LOPAP (rLOPAP) in yeast (*Pichia pastoris*) culture performed in 10 L bioreactor, by using a previously modified protocol of production, and the obtained protein was purified, and its stability evaluated by the enzymatic and cytoprotection activities. It was also carried out a production of rLOPAP, in the presence of an inhibitor of N-glycosylations, without any other change in the protocols followed for production, purification and stability evaluation. The protein secondary structure characterization was also accomplished. The production of rLOPAP was enhanced with automatic control of the pH, temperature, aeration and stirring. Dissolved Oxygen (DO), dry biomass and carbon source intake were also analyzed. A pre-seed stage was developed during 48 h in shaker, then an inoculum of 10% of the final volume of bioreactor was obtained, beginning a batch step, followed by a fed batch step. Both have used glycerol as carbon source. The lasting phase was a fed batch with methanol as carbon source, reaching the time of 120 h of total culture, to grow the biomass (reached 160 g/L) and produce the rLOPAP, excreted into the fermentation broth. Then, centrifugation and filtration were carried out, and the biomass was discarded. The supernatant undergone two chromatographic purification steps, an anionic exchange and then, size exclusion, both interchanged with a spin concentration or tangential filtration with molecular weight selective membranes. Total protein content, SDS-PAGE, enzymatic activity (prothrombin activation assay), enhancing cell culture viability, and circular dichroism (CD) were taken into account for the final purified materials. It was not observed differences on the migration pattern of the bands corresponding to rLOPAP in the SDS-PAGE, from the cultures with or without glycosylation inhibitor, what indicates that probably this protein is expressed with no N-glycosylations. The best result reached in the process related to protein concentration was 0.714 mg/L, and the expected prothrombin activation was not obtained. Nevertheless, an enhancing effect on HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelium Cells) culture was observed. Regarding the findings, the protein was expressed by *Pichia* yeast with correct size and sequence, but the rLOPAP would not be built up properly considering the secondary structure, which is a determinant for the enzymatic activity. That was supported by the CD results achieved, which showed a quite different profile in comparison to the signature of the

lipocalin group, a predicted secondary structure with expected predominant ratio of β -sheets over α -helices and random segments.

Keywords: *Lonomia obliqua*. LOPAP. Prothrombin activator. Pro-coagulant effect. Cytoprotection activity. Lipocalin. Recombinant protein production. *Pichia pastoris*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Fases do ciclo de vida de <i>Lonomia obliqua</i> (Walker).....	22
Figura 02 - Modelo esquematizado da espícula e estruturas de produção de veneno..	24
Figura 03 - Lagarta <i>Lonomia achelous</i> (Cramer) (CÓRDOBA et al, 2011).....	25
Figura 04 - Distribuição geográfica da <i>L. achelous</i> e <i>L. obliqua</i> (HOSSLER, 2010b).	26
Figura 05 - Representação esquemática da hidrólise de protrombina.	30
Figura 06 - Representação simplificada da ação do LOPAP na coagulação.	31
Figura 07 - Modelos de estrutura propostos para o LOPAP.....	34
Figura 08 - Esquema da estrutura típica das lipocalinas.	36
Figura 09 - Catabolismo do metanol em <i>Pichia pastoris</i>	42
Figura 10 - Diagrama geral de um vetor para <i>Pichia pastoris</i>	43
Figura 11 - Esquema de formação de N-glicosilação na proteína.....	45
Figura 12 - Estruturas finais comuns em N-glicosilação.	46
Figura 13 - Atividades realizadas.....	48
Figura 14 - Cultivo em agitador rotativo do clone de <i>P. pastoris</i> para expressar LOPAP recombinante.....	60
Figura 15 - Atividade enzimática do rLOPAP produzido em agitador rotativo, com e sem tunicamicina, e controle positivo.	61
Figura 16 - Atividade enzimática do rLOPAP produzido em agitador rotativo, sem tunicamicina.....	61
Figura 17 - Atividade enzimática do rLOPAP produzido em agitador rotativo, com tunicamicina.....	62
Figura 18 - Gel de SDS-PAGE do sobrenadante de cultivo em agitador rotativo.	62
Figura 19 - Biorreatores utilizados durante os ensaios.	64
Figura 20 - Ensaio 1: crescimento celular por X (g/L) e DO _{600nm} (Ab).	65
Figura 21 - Ensaio 2: crescimento celular por X (g/L) e DO _{600nm} (Ab).	65

Figura 22 - Ensaio 3: crescimento celular por X (g/L) e DO_{600nm} (Ab).	66
Figura 23 - Monitoramento da temperatura no biorreator durante o ensaio 1.	66
Figura 24 - Monitoramento da temperatura no biorreator durante o ensaio 2.	67
Figura 25 - Monitoramento da temperatura no biorreator durante o ensaio 3.	67
Figura 26 - Atividade enzimática de vários pontos de amostragens coletadas ao longo dos ensaios 1 e 2.	68
Figura 27 - Atividade enzimática apenas de pontos de amostragens coletadas ao longo dos ensaios 1, sem tunicamicina. Sem plotar controle positivo.	69
Figura 28 - Atividade enzimática apenas de pontos de amostragens coletadas ao longo dos ensaios 2, com tunicamicina. Sem plotar controle positivo.	69
Figura 29 - Atividade enzimática rLOPAP Butantan (A) e amostragem do término do ensaio 3 (B).	70
Figura 30 - Teste de reação com anticorpo policlonal Anti-LOPAP ("Dot Blot")	71
Figura 31 - Perfil cromatográfico da etapa de troca iônica.	72
Figura 31 - Perfil cromatográfico da etapa de gel filtração.	73
Figura 33 - SDS-PAGE de frações coletadas durante as etapas de purificação	74
Figura 34 - Teste de citoproteção em células HUVEC, em cultivo.	75
Figura 35 - Perfis de dicroísmo circular obtidos dos materiais purificados.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Componentes ativos descritos dos venenos de <i>L. obliqua</i> e <i>L. achelous</i> . ..27	27
Tabela 02 - Componentes ativos na saliva de hematófagos.37	37
Tabela 03 - Materiais purificados, recuperação e concentração proteica.73	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASP₁₅₄ - resíduo 154, aminoácido asparagina, na sequência primária do LOPAP

BBP - proteína ligadora de bilina

BMGY - meio complexo de glicerol tamponado

BMMY - meio complexo de metanol tamponado

CAM - molécula de adesão celular

CD - dicroísmo circular

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

CRD - domínio de região conservada

DNA - ácido desoxirribonucleico

DO_{600nm} - densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm

FPLC - cromatografia líquida para proteína

FX - fator X ou de Stuart de coagulação sanguínea

FXa - fator X ou de Stuart de coagulação sanguínea ativado

g - aceleração da gravidade

GF - cromatografia de gel filtração

HUVEC - células do endotélio de cordão umbilical humano

ICAM-1 - molécula de adesão intercelular

kDa - 10³ daltons

L - alça

LOPAP - protease ativadora de protrombina da lagarta *Lonomia obliqua*

LOSAC - protease ativadora de fator de Stuart da lagarta *Lonomia obliqua*

mAb - 10⁻³ x unidades de absorbância

MTT - (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

NO - óxido nítrico

OST - oligossacaril transferase

pH - potencial hidrogeniônico

PTM - solução traços de metais para *Pichia*

QFF - cromatografia de troca iônica em coluna de *Q-sepharose*

q.s.p - quantidade suficiente para

RBP - proteína ligadora de retinol

rLOPAP - protease recombinante ativadora de protrombina da lagarta *Lonomia obliqua*

SFB - soro fetal bovino

SCR - região estritamente conservada

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com denaturante dodecilsulfato

U - quantidade de enzima que catalisa 1 μmol de substrato em produto por minuto, nas condições de ensaio – (*Enzyme Commission*)

YNB - meio levedura e nitrogênio

YPD - meio levedura, extrato de peptona e glicose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1	<i>Lonomia obliqua</i>	21
2.2	<i>O envenenamento com Lonomia obliqua e o LOPAP</i>	27
2.3	<i>Lipocalinas</i>	35
2.4	<i>Produção de Proteínas Heterólogas em Pichia pastoris</i>	40
3	OBJETIVOS	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1	<i>Materiais</i>	48
4.1.1	Modificação da levedura para expressão de rLOPAP	49
4.1.2	Meios de cultura	50
4.2	<i>Métodos</i>	51
4.2.1	Ensaio em agitador rotativo	51
4.2.2	Produção de rLOPAP em biorreator	52
4.2.2.1	Preparo do banco de trabalho	52
4.2.2.2	Preparo do inóculo	53
4.2.2.3	Preparo do biorreator	53
4.2.2.4	Ensaio com inibidor de glicosilação	53
4.2.2.5	Parâmetros controlados durante os ensaios	53
4.2.3	Separação do sobrenadante	54
4.2.4	Diafiltração	54
4.2.5	Purificação do rLOPAP	55
4.2.5.1	Cromatografia de troca aniônica	55
4.2.5.2	Cromatografia de gel filtração	55
4.2.6	Atividade enzimática com substrato cromogênico S-2238	56
4.2.7	Dosagem de proteínas por Bradford	56
4.2.8	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	57
4.2.9	Avaliação da atividade citoprotetora do rLOPAP	57
4.2.10	Análise de dicroísmo circular (CD) do rLOPAP purificado	58
5	RESULTADOS	59
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

LOPAP (protease ativadora de protrombina da largata *Lonomia obliqua*) é uma proteína classificada como pertencente à família das lipocalinas (REIS et al., 2006), um grupo de proteínas com estrutura primária geralmente entre 160 à 180 resíduos de amino ácidos, que embora apresentem baixa homologia entre si, em torno de 20%, compartilham uma estrutura terciária característica, tipicamente um β -barril, ou seja, uma estrutura formada de oito folhas- β antiparalelas que se fecham sobre si mesmas, protegendo um núcleo hidrofóbico, enquanto externamente uma α -hélice na extremidade C-terminal e quatro alças de ligação na abertura do barril completam a estrutura. A variabilidade dos aminoácidos que compõem essas alças e a interação proporcionada pela exposição de suas cadeias laterais, dá a especificidade a seus ligantes (SKERRA, 2008) e traduzem a principal, mas não única função dessa família de proteínas, o transporte de pequenas moléculas hidrofóbicas (FLOWER, 1996; FLOWER et al., 2000; SKERRA, 2000).

Embora LOPAP seja classificado como uma lipocalina, sua atividade mais conhecida ou estudada, por ser uma toxina, é a atividade enzimática do tipo serino protease, que promove a clivagem da protrombina (REIS et al., 2001b), em intensidade dose dependente, formando trombina, de forma semelhante ao que é realizado pelo complexo protrombinase, e a ação dessa trombina sobre o fibrinogênio resulta na ativação do sistema de coagulação (DONATO et al., 1998). A quantidade de trombina formada pode causar depleção de fibrinogênio e instauração de um quadro de coagulopatia de consumo (ZANNIN et al., 2003), levando a incoagulabilidade sanguínea.

A toxina LOPAP foi isolada da *Lonomia obliqua*, uma espécie de mariposa encontrada principalmente na região sul do Brasil (REIS et al., 2001b). Na fase larval apresenta-se como uma lagarta castanho-escura, com listras longitudinais contínuas marrom-escuras contornadas de preto no dorso e marrom-escuras manchadas de branco nas laterais (LORINI; CORSEUL, 2001). Na fase adulta tem aproximadamente 5 cm e o dorso recoberto de cerdas esverdeadas ramificadas e rígidas, em formato de “pinheiros de espinhos”, as quais contém várias substâncias, dentre elas a toxina LOPAP (RICCI-SILVA et al., 2008; VEIGA et al., 2005).

O contato da pele da vítima com as cerdas da *L. obliqua* causa a inoculação do veneno no organismo. O quadro clínico depende da quantidade de veneno

inoculado, que por sua vez depende da área do corpo da vítima que sofreu contato e do número de lagartas (VULINEC, 1990). O paciente pode apresentar sintomas como dermatite urticante, cefaleia, náusea, êmese, dor muscular, hematomas, hemorragias em mucosas e feridas abertas, hemorragias pulmonares e glandulares (DUARTE et al., 1990; KELEN et al., 1995), podendo evoluir a óbito por hemorragia intracerebral e insuficiência renal.

A ocupação humana em áreas de vegetação, originalmente habitado pela *L. obliqua*, promoveu redução ou extinção de seus predadores naturais e levou à adaptação da lagarta a outros tipos de alimentação introduzidos pelo homem, como árvores frutíferas por exemplo. Acidentes por contato com a lagarta começaram a ser mais frequentes desde o final da década de 80 (LORINI; CORSEUL, 2001).

No Instituto Butantan, o processo de desenvolvimento de um soro para tratamento das vítimas de acidentes com essa lagarta (DIAS-DA-SILVA et al., 1996), despertou no grupo o interesse pelo entendimento das toxinas responsáveis pelos efeitos em pacientes e pela de utilização das toxinas com finalidades terapêuticas. Iniciaram-se estudos do LOPAP, que foi extraído do extrato de cerdas da lagarta, purificado e caracterizado quanto à atividade química e biológica (REIS et al., 2001a, 2001b, e 2006). Para se conseguir um aumento de escala na obtenção da proteína seu gene codificador foi identificado e clonado em linhagens de *Escherichia coli* (REIS et al., 2006) e *Picchia pastoris* (CARRIJO-CARVALHO, 2009) tornando possível a produção de LOPAP recombinante (rLOPAP) através de cultivo celular em biorreator. A obtenção de rLOPAP permitiu estudos de atividade química e fisiológica, complementando os estudos estruturais e biológicos realizados com a proteína nativa extraída da lagarta *Lonomia* (CARRIJO-CARVALHO, 2009).

As lipocalinas se destacaram primeiramente por sua função de transporte e estocagem de moléculas de baixa solubilidade ou lábeis, tais como retinol (BLANER, 1989), esteroides (CROW; NELSON; REMINGTON, 2009) ou produtos metabólicos (DAHLBÄCK; NIELSEN, 2006 e 2009). Sabe-se que as lipocalinas exercem também outras funções fisiológicas diversas (FLOWER et al., 2000; SCHLEHUBER; SKERRA, 2005), dentre elas atuação citoprotetora (WAISMAM et al., 2009), sinalização celular e antiapoptose (FRITZEN et al., 2005). Um sítio estrutural preservado e característico desta família de proteínas, denominado pM2b e presente no LOPAP, teve comprovada a sua ação na modulação da sobrevivência celular (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; MESQUITA PASQUALOTO et al., 2013).

Lesões cutâneas em cobaias tratadas por um peptídeo sintético com a sequência do sítio pM2b mostraram um processo de aceleração na reparação da matriz extracelular, com aumento significativo de produção de colágeno nas feridas (WLIAN et al., 2014).

O LOPAP, por ser uma lipocalina de 185 resíduos de amino ácidos, uma das maiores de sua classe, e já contar com um processo de produção escalonável, passível de ser aprimorado, apresenta a princípio um grande potencial biotecnológico para ser explorado, seja como uma proteína terapêutica ou como ferramenta biotecnológica para suplementação de meios de cultura.

Neste trabalho estudou-se a produção de LOPAP recombinante em cultura de levedura *Pichia pastoris*, em biorreator de 10 L, utilizando um protocolo de produção previamente modificado. A proteína obtida foi purificada e sua estabilidade avaliada pelas atividades enzimática e citoprotetora. Foi feito também a produção de LOPAP, seguindo o mesmo procedimento, mas com a adição ao meio de cultivo de um inibidor de N-glicosilações. As etapas de purificação e os testes de estabilidade foram feitos da mesma forma. A análise da estrutura secundária de todos os produtos purificados obtidos ao final também foi realizada e os resultados comparados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Lonomia obliqua*

A ordem das *Lepidopteras*, uma das mais diversificadas dentro da classe *Insecta*, com número de espécies estimado entre 125.000 e 150.000 (GULLAN; CRANSTON, 2004; HEPPNER, 1991), incluem as borboletas e as mariposas. Estes insetos têm sido amplamente estudados pela humanidade há muitos anos, por três motivos especiais: a milenar produção de fios de seda, os efeitos prejudiciais que alguns causam à agricultura, diminuindo a produção e implicando em perdas econômicas e por último porque alguns integrantes deste grupo representam riscos à saúde do homem, causando acidentes de intoxicação e envenenamento (CÓRDOBA et al., 2011).

As principais famílias de lepidópteros causadores de acidentes são *Megalopygidae* e *Saturniidae*. Lagartas são as formas larvais destes insetos, conhecidos popularmente como taturana, oruga, ruga ou lagarta-de-fogo, e estão agrupadas em duas subordens: a *Rhopalocera*, das borboletas que voam e se alimentam à luz do dia, e a *Heterocera*, das mariposas que têm hábitos noturnos (HOSSLER, 2010a). No Brasil aponta-se a existência de mais de 25.000 espécies de lepidópteros (BROWN Jr; FREITAS, 1999). As lagartas do gênero *Lonomia* têm 26 espécies catalogadas e distribuídas pelas Américas do Sul e Central (GARCIA, 2006; LEMAIRE, 1972), e duas espécies descritas, a *Lonomia obliqua* e a *Lonomia achelous*, vêm adquirindo nas últimas 3 décadas maior relevância em função do aumento de casos de envenenamento com manifestações sistêmicas caracterizadas por sangramentos (CARDOSO; HADDAD, 2005), incluindo termos em óbitos (KOWACS et al., 2006).

Lonomia obliqua (Walker) é uma espécie de mariposa, da família *Saturniidae*, que tem seu habitat natural no Brasil na região sul e nos estados de São Paulo e Minas Gerais, e também na Argentina, Uruguai e Paraguai. O ciclo de vida da *Lonomia obliqua* compreende 4 fases, do crescimento à metamorfose: ovos, larvas (lagartas), pupas e mariposas. Estas formas estão apresentadas na **Figura 01**.

Figura 01 - Fases do ciclo de vida de *Lonomia obliqua* (Walker).

Legenda: A e C- Forma larval no sexto instar. B- Ovos depositados em folha. D- Pupas de *L.obliqua*. E e F- Mariposas. O macho de cor amarelo-alaranjado e a fêmea, cor castanha. G e H- Fotomicrografia de espículas de larvas. Seta azul no rodapé das figuras indica o tempo médio de cada fase do ciclo de vida da *L. obliqua*, em dias: ovos (17), larva (90), pupa (30 a 100) e mariposa (8). **Fontes:** A- Chan et al. (2008); B, E e F- Caovilla (2003); C e D- Chudzinski-Tavassi et al. (2013); G e H- Veiga et al. (2001).

As mariposas *L. obliqua*, indivíduos adultos, vivem de 8 a 10 dias durante os quais não se alimentam, pois possuem o aparelho bucal atrofiado, apenas se acasalam produzindo ovos. Os ovos são postos em folhas de várias árvores como cedro, araticum, borracha, figueira-do-mato e ipê, entretanto, devido à devastação das matas nativas, elas se adaptaram para as árvores frutíferas, tais como as de abacate, pera, pêssego, ameixa, amora silvestre e banana. Uma média de 70 ovos são depositados por cada fêmea e as futuras lagartas, que eclodem dos ovos de 15 a 30 dias depois, se alimentam de folhas durante a noite e descem para o tronco das árvores durante o dia, onde permanecem agrupadas em descanso (estado gregário).

Estas lagartas passam por 6 estágios de crescimento, denominados ínstaes, que duram ao todo cerca de 90 dias, e ao final deste período, se transformam em pupas ou crisálidas, presas ao tronco das árvores e próximas ao solo, ficando neste estado de metamorfose por um período de 30 a 100 dias, ao final do qual se transformam em mariposas, que vivem cerca de oito dias, e reiniciam o ciclo (CARRIJO-CARVALHO, 2009; LORINI; CORSEUL, 2001).

Morfológicamente, os ovos de *L. obliqua* apresentam-se elipsoidais, em média com 1,98 mm x 1,45 mm x 1,61 mm (altura x largura x comprimento), inicialmente possuem uma coloração esverdeada clara, com pequenas cavidades escuras no topo (micrópilas), e com o amadurecimento tornam-se translúcidos, possibilitando visualizar o embrião em formação. As larvas iniciam o primeiro ínstar com cerca de 5 mm de comprimento, corpo marrom escuro recoberto por poucos pelos, e amadurecimento no sexto instar, com aproximadamente 6 cm, com dorso recoberto por espículas ramificadas rígidas na forma de pinheiros esverdeados, em contraste ao corpo castanho com listras brancas e marrom escuras longitudinais. O veneno, composto de várias proteínas, segundo alguns autores, é produzido no epitélio basal e armazenado na cutícula e no interior oco das espículas, que ao contato com a pele da vítima se partem com facilidade, pois possuem uma ponta articulada de ligação mais frágil, que adentra a epiderme (VEIGA et al., 2001). A **Figura 02** apresenta o modelo esquematizado da estrutura das espículas e de produção do veneno.

Figura 02 - Modelo esquematizado da espícula e estruturas de produção de veneno.

Adaptado de Veiga et al.(2001). **Legenda:** h- hemolinfa; bl- lâmina basal; f- dobraduras no epitélio; eT- epitélio na base do tegumento; c- cutícula; n- núcleo de células epiteliais; g- grânulos de secreção em células epiteliais; dc- grupo de células secretoras diferenciadas na espícula; co- grânulos de coalescência; es- epitélio da espícula; art- ligação frágil articulada que se quebra durante contato físico; ic- canal interno; t- ponta; v- veneno.

As crisálidas, estágio seguinte do ciclo, apresentam dimorfismo sexual, sendo as das fêmeas de maior tamanho, comprimento médio de 30,23 mm, contra as de 28,73 mm dos indivíduos machos, e têm coloração amarelada nas primeiras horas, mas que escurece para marrom avermelhado, cor que permanece até a eclosão. As mariposas adultas, último estágio do ciclo, também têm dimorfismo sexual, o macho tem cerca de 6 cm de comprimento, asas amarelas alaranjadas com linhas pretas transversais, enquanto a fêmea é maior e com asas marrom acinzentadas (CHUDZINSKI-TAVASSI; ALVAREZ-FLORES, 2013; LORINI; CORSEUL, 2001).

A *Lonomia achelous* (Cramer), embora de mesmo gênero, apresenta grandes diferenças na morfologia, habitat e mecanismos de ação de veneno sobre a cascata de coagulação (GUERRERO et al, 2011; HOSSLER, 2009 e 2010a; LUCENA et al, 2008). A *L. achelous* é encontrada principalmente desde o México, Venezuela, Guiana e o norte do Brasil nos estados do Pará, Amapá e Maranhão (HOSSLER, 2010b; RICCI-SILVA et al., 2008). As substâncias tóxicas que produz foram também encontradas na sua hemolinfa (GUERRERO et al, 2011). Nas figuras **03** e **04** pode-se visualizar, respectivamente, a apresentação morfológica diferente de indivíduos na fase larval de *L. achelous* e as distribuições geográficas das espécies *L. obliqua* e *L. achelous*.

Figura 03 - Lagarta *Lonomia achelous* (Cramer) (CÓRDOBA et al, 2011).

Lonomia achelous.

Figura 04 - Distribuição geográfica da *L. achelous* e *L. obliqua* (HOSSLER, 2010b).

Os sintomas característicos que as vítimas de *L. achelous* e *L. obliqua* apresentam são parecidos e divididos como gerais (dor de cabeça, tontura, náusea, dor abdominal e mialgia), locais (dor intensa, vermelhidão, edema, calor, sensação de queimação) e manifestações sistêmicas hemorrágicas severas entre 12 a 24 horas posteriores ao contato, como sangramentos na pele e mucosas, hematúria, e em casos mais graves, sangramento pulmonar, intracerebral, falência renal e óbito (AROCHA-PIÑANGO; MARVAL; GUERRERO, 2000; BERGER et al., 2014). Enquanto *L. achelous* ocasiona dano por associação de toxinas coagulantes, fibrolíticas e anticoagulantes, na *L. obliqua* estão relatados principalmente toxinas pró-coagulantes. Na **Tabela 01** são apresentados, de forma resumida, alguns componentes identificados dos venenos de cada espécie.

Tabela 01 - Componentes ativos descritos dos venenos de *L. obliqua* e *L. achelous*.

LAGARTA	ATIVIDADE	NOME DO AGENTE
<i>Lonomia achelous</i>	Tipo plasmina	Lonomin II (achelases I e II)
	Ativador direto de protrombina	Lonomin III
	Tipo Fator Xa	Lonomin IV
	Proteolítico de Fator XIII - atividade semelhante à uroquinase	Lonomin V
	Ativador do Fator V	Lonomin VI:a
	Inibidor de Fator V	Lonomin VI:i
	Tipo calicreína	Lonomin VII
<i>Lonomia obliqua</i>	Ativador de Protrombina	LOPAP
	Ativador do Fator X	Não Reportado*
	Tipo Ativador de fosfolipase A2 (PLA2)	Lonomiatoxina

Adaptado de Arocha-Piñango; Marval; Guerrero (2000). *Posteriormente, em 2005, Chudzinski-Tavassi e Alvarez-Flores divulgaram trabalho com um ativador de FX de *L. obliqua*, nomeado como LOSAC.

2.2 O envenenamento pelo contato com *Lonomia obliqua* e o LOPAP

O primeiro registro de envenenamento causado por contato com lagarta do gênero *Lonomia* foi reportado no Brasil por Zoroastro Alvarenga¹ (1912) apud Garcia; Danni-Oliveira (2007). Em 1967 foram registrados 5 casos de síndrome

¹ MORAES, R. H. P. **Identificação dos Inimigos Naturais de *Lonomia obliqua* Walker, 1855 (Lepidóptera: Saturniidae) e possíveis fatos determinantes do aumento de sua população.** 2002. Dissertação de Mestrado. Escola Superior “Luiz Queiroz Filho”. Piracicaba, 2002.

hemorrágica após contato com lagartas na Venezuela (ARROCHA-PIÑANGO; GUERRERO, 2001) e atualmente há registros de mais de 10.000 incidentes com *Lonomia* reportados no total de Brasil, Guiana Francesa, Peru, Paraguai, Argentina e Colômbia (CHUDZINSKI-TAVASSI; ALVAREZ-FLORES, 2013).

Gamborgi e colaboradores (2012) reportaram um dado importante do Ministério da Saúde, estabelecendo que estatisticamente a letalidade de acidentes com lagartas *Lonomia* no Brasil era de 3 a 4 vezes maior do que a média de acidentes com ofídios venenosos. O Guia de Vigilância Epidemiológica de 2010 (reimpressão da edição 7 de 2009) do Ministério da Saúde relata que em 2008 no Brasil foram registrados 598 acidentes com *Lonomia* e 2.210 acidentes com outras lagartas, resultando em 2 óbitos por *Lonomia* (letalidade de 0,3%) e 3 óbitos por outras lagartas (letalidade de 0,1%). Comparativamente, no mesmo documento, reporta-se que em 2008 ocorreram 26.905 acidentes com ofídios, com letalidade baixa de 0,4%. Não há dados mais recentes disponibilizados.

O tratamento das vítimas de acidentes com *L. obliqua* é feito com soro de anticorpos IgG policlonais (SALon), purificados do plasma do sangue de equinos, inoculados com extrato de cerdas destas lagartas, desenvolvido e produzido no Instituto Butantan (DIAS DA SILVA et al., 1996). Anticorpos monoclonais murínicos humanizados contra toxinas da *L. obliqua*, para tratamento de vítimas que tiveram um segundo incidente de contato com estas lagartas, foram estudados por Mercadante (2008). Segundo o autor, os pacientes que receberam tratamento com soro SALon podem vir a desenvolver anticorpos contra os anticorpos policlonais equinos, condição conhecida como “doença do soro”, mas pacientes tratados com anticorpos monoclonais apresentam menores índices de reações de sensibilização.

Kelen et al. (1996) foram os primeiros a descrever a síndrome hemorrágica causada pelas lagartas *L. obliqua*, que infringia uma diminuição drástica nos níveis de fibrinogênio, fatores V e XIII, plasminogênio, α -2-antiplasmina e na atividade da proteína C, indicando um quadro de coagulopatia de consumo e fibrinólise. Reis et al. (1999) identificaram uma das substâncias sugerida como protagonista neste quadro clínico, um ativador de protrombina com atividade serino protease dependente de íons cálcio (Ca^{2+}), realizando testes com frações purificadas do extrato de cerdas de *L. obliqua* por cromatografia líquida preparativa em reação com protrombina e substrato cromogênico para trombina. A fração que mostrou alta atividade, foi estimada com massa molecular de 69 kDa, por SDS-PAGE, e assumiu-

se como uma proteína de cadeia única, nomeada como LOPAP (“*Lonomia obliqua* Prothrombin Activator Protease” ou Protease Ativadora de Protrombina de *Lonomia obliqua*).

Testes posteriores de Reis (2001b) propuseram um mecanismo de ação para o LOPAP. Este, clivou a protrombina, formando os produtos fragmento 1.2 e pretrombina 2, sem a formação de meizotrombina e trombina, de forma semelhante ao FXa na ausência do complexo de protrombinase. Como o substrato cromogênico foi desenhado para ter a mesma ligação Arg₂₈₄ – Thr₂₈₅ que é clivada pela trombina ativada, verificou-se que o LOPAP tinha ação catalítica na mesma ligação peptídica. Ainda, da fração purificada de LOPAP, identificaram apenas um peptídeo N-terminal, o que corroborou para a hipótese inicial de uma cadeia única de 69 kDa. Verificaram homologia com a insecticianina de lagarta *Manduca sexta*, uma proteína da hemolinfa da lagarta do fumo. Outra constatação importante apresentada foi a não ativação do FX pelo LOPAP, mostrando sua especificidade. A forma do LOPAP de clivar a protrombina e sua ação na cascata de coagulação estão ilustradas, respectivamente, nas **Figuras 05 e 06**.

Figura 05 - Representação esquemática da hidrólise de protrombina.

O LOPAP cliva a protrombina seguindo a sequência apresentada no lado esquerdo, mimetizando a ação do FXa. (CARRIJO-CARVALHO, 2009).

Figura 06 - Representação simplificada da ação do LOPAP na coagulação.

Modificado de Chudzinski-Tavassi et al. (2013). **Legenda:** Barras escuras duplas indicam onde inibidores atuam. **HMWK**= cininogênio de alta massa molecular. **PK**= pré-caliceína. **KK**= caliceína. **CI-INH**= inibidor de Cl. **TFPI**= inibidor de via do fator tissular. **PL**= fosfolipase. **Ca**= íons cálcio. **AT**= antitrombina. **FPA**= fibrinopeptídeo A. **FPB**= fibrinopeptídeo B. **TAFI**= inibidor de ativador de fibrinólise de trombina. **FnDP**= produtos de degradação de fibrina. **FgDP**= produto de degradação de fibrinogênio. **α 2-AP**= antiplasmina α 2.

Fritzen e colaboradores (2005), utilizando LOPAP purificado de extrato de cerdas de *L. obliqua*, verificaram que células HUVEC ("Human Umbilical Vein Endothelial Cell" ou células do endotélio de cordão umbilical humano), quando tratadas com LOPAP, mostraram estímulo na liberação de NO (óxido nítrico) e PGI_2 . Verificaram também outra ação moduladora celular do LOPAP sobre estas células, o aumento da expressão de moléculas de adesão celular (CAM) ICAM-1 e E-selectina que promovem a atração, adesão e migração trans-endotelial de monócitos e neutrófilos *in vivo*, dando respaldo aos resultados observados por Reis et al.

(2001a), quanto à migração de leucócitos nos tecido alveolar de cobaias tratadas com LOPAP. Nas culturas de cordão umbilical HUVEC, tratadas com LOPAP, e comparadas com culturas controle, percebeu-se que em situação de stress, o LOPAP promoveu um aumento no tempo de vida das células, inferindo-se que o LOPAP também exerce um efeito citoprotetor, evitando a morte celular. Mais recentemente, Chudzinski-Tavassi et al. (2010) provaram que essa propriedade em particular deve-se aos CRD's ("*Conserved Region Domain*"), sequências de peptídeos conservadas na estrutura primária do LOPAP, os quais foram sintetizados e utilizados em cultura de HUVEC, induzindo a mesma ação citoprotetora.

A proliferação e viabilidade de linhagens celulares, expostas ao extrato bruto de cerdas e hemolinfa de *L.obliqua*, foi avaliada em um estudo recente, encontrando resultados de estimulação para algumas linhagens (U138-MG e HT-29, células tumorais de glioma), com aumento de produção de cAMP e redução do óxido nítrico, e de inibição para outra linhagem (V-79, não tumoral), indicando que com a presença de várias substâncias no veneno, muitas ainda não isoladas, resultados de estimulação contrários podem ocorrer, necessitando de mais estudos de estimulação celular com as substâncias separadamente (HEINE et al., 2014).

Reis et al. (2006) partindo do peptídeo N-terminal de 46 resíduos de amino ácidos, traduzidos em um oligonucleotídeo de DNA complementar à esta sequência para compor um *primer*, conseguiram localizar em uma biblioteca de cDNA a sequência codificadora de LOPAP maduro (sem o peptídeo sinal de 16 aminoácidos). A fita de cDNA encontrada foi sequenciada e um *primer* antisenso desta sequência foi desenhado. Ambos *primers*, senso e antisenso, foram utilizados para amplificar a sequência codificadora do LOPAP. Esta foi então montada em um plasmídeo e inserida em linhagem *E. coli* BL12 (DE3), resultando em um mutante capaz de produzir r-LOPAP, na forma de corpúsculos de inclusão, que foram coletados, separados e tratados para estruturação correta da proteína, obtendo-se como produção total 3,5 mg de r-LOPAP/L de cultura. O r-LOPAP expresso mostrou-se ativo na clivagem da protrombina e incapaz de ativar o FX, equivalente ao verificado pela proteína nativa. Os fragmentos liberados da clivagem da protrombina com r-LOPAP foram iguais aos clivados pela LOPAP nativa (analisados por SDS-PAGE).

O r-LOPAP foi caracterizado estruturalmente, quanto a sua cadeia primária, deduzido da sua sequência de nucleotídeos; quanto a sua estrutura secundária, que revelou um percentual de 6,8% de α -hélices e 53,2% de folhas- β por dicroísmo circular, equivalentes aos 6,7% e 55,9% respectivos da proteína LOPAP nativa; quanto à sua estrutura terciária, esta foi inferida baseando-se na alta homologia encontrada de sua sequência primária alinhada com proteínas da família das lipocalinas, como a insecticianina A (HOLDEN et al., 1987) e outras: bombirina, apolipoproteína D, prostaglandina H₂ D isomerase e BBP-1 (*"bilin binding protein-1"*, proteína que se liga a bilina), da lagarta *Samia cynthia ricini*, que resultou em mais de 50% de identidade. Foi a primeira lipocalina descrita com atividade proteolítica (REIS et al., 2006) e única molécula ativadora de protrombina presente em veneno de artrópodes até então descrita (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2014).

O r-LOPAP, com um tamanho estimado de 20,1 kDa, divergiu do valor encontrado de 69 kDa até então para a proteína nativa purificada do extrato de espículas, entretanto, o modelo espacial de uma conformação em tetrâmero da proteína nativa mostrou-se compatível, mantendo o sítio catalítico predito exposto ao solvente e a acessibilidade ao núcleo hidrofóbico do barril- β para ligantes. Na **Figura 07** são exibidos os modelos propostos.

Figura 07 - Modelos de estrutura propostos para o LOPAP.

Adaptado de Reis et al. (2006). Na parte A está o modelo proposto de estrutura terciária. Oito folhas- β antiparalelas ($\beta 2$ a $\beta 9$) formam o barril- β típico das lipocalinas. Uma estrutura de molécula de biliverdina é colocada como exemplo de substância transportada. Átomos de cálcio são ilustrados como esferas "Ca". O sítio catalítico proposto é formado pela serina 119, glutamato 167 e histidina 168. Na parte B a interação de quatro moléculas de LOPAP forma o modelo proposto de estrutura quaternária, um tetrâmero.

2.3 Lipocalinas

As lipocalinas são uma classe de proteínas que apresentam características estruturais surpreendentemente preservadas, embora com uma baixa homologia entre suas estruturas primárias, sendo muito comuns valores inferiores a 20%. Estão presentes em vertebrados, invertebrados, plantas e bactérias. A primeira lipocalina descrita foi a RBP (*retinol binding protein* ou proteína ligadora de retinol), cuja estrutura tridimensional foi elucidada por Newcomer et al. (1984), um ano antes de Brew e Pervaiz (1985) cunharem o termo lipocalinas (do grego *calyx*, ou “copo”). São exemplos de lipocalinas proteínas responsáveis pela coloração de invertebrados e larvas de borboletas, como insecticianina ou a *bilin-binding protein* (BBP), proteína ligadora de bilina, a crustacianina, responsável pela coloração em lagostas, a α_2 -globulina urinária, transportadora de feromonios em roedores, proteínas do plasma humano de importância clínica como a α_1 -ácido glicoproteína e α_1 -microglobulina, a β -lactoglobulina, proteína do leite de ruminantes, entre outras (AKERSTROM; FLOWER; SALIER, 2000; SCHLEHUBER; SKERRA, 2005).

A estrutura típica desta família de proteínas é bem descrita (Figura 08): uma mesma estrutura primária pequena, geralmente de 160 à 180 resíduos, forma oito folhas- β , que têm orientações antiparalelas, ligadas por pontes de hidrogênio, que se fecham sobre si numa orientação altamente simétrica, formando a estrutura de um barril (barril- β). Dois sítios de ligação, um no interior do barril e outro formado pelas 4 alças de ligação entre as fitas presentes na entrada do barril- β , conferem especificidade a seus ligantes. A estrutura tem outras 3 alças de ligação na outra extremidade do barril, por onde também cruza a porção N-terminal primária, fechando este lado do barril- β . A estrutura se completa com uma α -hélice da porção C-terminal. *Structurally Conserved Region* (SCR) ou *motifs* são 3 segmentos da estrutura primária que são altamente preservados. As lipocalinas que compartilham todos os 3 SCR são classificadas como núcleo ou *kernel*, outras que compartilham 2 ou apenas 1 são *outliers* (FLOWER; NORTH; SANSOM, 2000).

Figura 08 - Esquema da estrutura típica das lipocalinas.

Modificado de Flower; North; Sansom (2000). **Legenda:** As folhas- β de A à H formam o “barril β ”. Um seguimento de folha- β , identificado como I, também aparece antes da porção carboxi-terminal, identificado como C, após uma α -hélice identificada como A1. As alças L1, L3, L5 e L7 estão localizadas na entrada do núcleo hidrofóbico e são responsáveis em parte pelo reconhecimento de ligantes; as alças L2, L4 e L6 estão na base do barril- β que é bloqueada por uma porção da extremidade N-terminal, identificada como N. As linhas pontilhadas são a representação de pontes de hidrogênio que estabilizam a estrutura. As regiões de estrutura conservada estão separadas em quadrados de traço mais escuro e identificadas como SCR1, SCR2 e SCR3.

Muitas lipocalinas exercem outras funções além de transportar moléculas, como a modulação do crescimento celular (apolipoproteína D, purpurina, K1-microglobulina), regulação da resposta imune (α_1 -microglobulina) e percepção de odores (*odorant binding protein*), entre outras. Particularmente entre os artrópodes sugadores de sangue, várias lipocalinas têm sido identificadas na saliva destes insetos, executando diversas funções que garantem a eficiência no repasto de sangue da presa. A proteína Triabin foi a primeira lipocalina identificada na saliva de um hematófago, o *Triatoma pallidipennis*. Ela reconhece e se liga à trombina formando um complexo não covalente, impedindo a agregação plaquetária induzida por trombina, e prolongando o tempo de coagulação do sangue por esta via (NOESKE-JUNGBLUT et al., 1995). *Rhodnius prolixus*, um dos vetores da doença

de Chagas, tem em sua saliva 9 proteínas identificadas que exercem ação anti-hemostática e 7 delas são lipocalinas (ANDERSEN et al., 1997, 1998 e 2005).

Lipocalinas transportadoras de óxido nítrico (NO), chamadas de nitroforinas, têm em seu *core* hidrofóbico um grupo heme fortemente fixado por interações com 10 resíduos hidrofóbicos e uma histidina que faz a quinta ligação do átomo de ferro (Fe). O NO é mantido ligado ao átomo de ferro do grupo heme, protegido dentro do barril- β , e liberado na circulação da presa através da saliva, agindo como vasodilatador e relaxante muscular, aumentando o volume de sangue disponível, em ação antagonista às histaminas vasoconstritoras do processo inflamatório instaurado. Duas proteínas da saliva do carrapato *Rhipicephalus appendiculatus* também são lipocalinas. Na **Tabela 02** são apresentadas, de forma resumida, essas informações.

Tabela 02 - Componentes ativos na saliva de hematófagos.

Inseto	Proteína	Atividade	Função proposta
<i>R. prolixus</i>	NP1-4	transportador de NO	vasodilatação, redução de agregação plaquetária
	NP1-4	ligante de histamina	redução da inflamação e da resposta imune; eficiente liberador de NO
	NP2	anticoagulação	inibição coagulação sanguínea (fator X)
	RPAI 1-3	inibição de plaquetas	redução de agregação plaquetária
<i>R. appendiculatus</i>	HPB 1-3	ligante de histamina	redução da inflamação e da resposta imune
<i>O. moubata</i>	Moubatin	inibição de plaquetas	redução de agregação plaquetária
<i>T. pallidipennis</i>	Triabin	anticoagulação	inibição coagulação sanguínea (fator X)
	Pallidipin	inibição de plaquetas	redução de agregação plaquetária

Modificado de Montfort; Weichsel; Andersen (2000).

A recorrente presença das lipocalinas em múltiplos organismos de insetos, especialmente hematófagos e lepidópteros, sugere um antepassado comum. No trabalho de Sanchez et al. (2003) foram encontradas evidências para a hipótese de

um metazoário primitivo, que transferiu sua herança genética para artrópodes e cordatos.

O grupo de Andersen et al. (1998) investigou as estruturas da BBP e da insecticianina, lipocalinas de lepidópteros, e suas capacidades de se ligarem a produtos de reações de quebra do grupo heme, concluindo que há forte sugestão que a produção e ligação da biliverdina deve ter servido como uma etapa evolucionária de pré-adaptação para a ligação de NO pelas nitroforinas. O grupo heme é notadamente uma molécula planar, formada por um anel porfirínico e um átomo de ferro central, entretanto na biliverdina-IX_γ ocorre a quebra deste anel central, o que possibilita um rearranjo helicoidal da molécula. Sua ligação com um análogo recombinante do LOPAP, o BBPLo (*bilin binding protein of Lonomia obliqua*), que difere em apenas quatro aminoácidos do LOPAP, formando um complexo estável mesmo à separação por cromatografia de exclusão por tamanho, foi verificado por Veiga et al.(2014).

Há um grande interesse em se utilizar lipocalinas com fins biotecnológicos ou como um biofármaco, explorando suas propriedades singulares, especialmente sua função de transporte. Seu barril-β é resistente a algumas modificações de amino-ácidos e mantém a forma terciária, característica do grupo, ao passo que suas alças superiores permitem substituições que modulam a afinidade por ligantes específicos (AZAD et al., 2012; FUKUHARA et al., 2012; HOHLBAUM; SKERRA, 2007; RICHTER; EGGENSTEIN; SKERRA, 2014; SCHLEHUBER; SKERRA, 2005; SKERRA et al., 2013; WURCH; PIERRÉ; DEPIL, 2012).

RBP (proteína que liga em retinol) por ter sido a primeira lipocalina descrita em maiores detalhes foi também a primeira a ser estudada como um *scaffold* (“estrutura de suporte”, em tradução livre), para tentar inserir um grupo da anidrase carbônica II que se liga a zinco (II), estudo feito para prova de conceito (MÜLLER; SKERRA, 1994; SKERRA, 2000). Uma proposta inovadora foi a utilização de lipocalinas como antídotos direcionados contra compostos de pequena massa molecular, a qual inclusive deu origem ao novo termo “anticalinas”, em uma alusão funcional aos anticorpos (BESTE et al, 1999; SKERRA, 2000), especificamente uma lipocalina modificada por “engenharia” para ter alta afinidade aos digitálicos de uso cardíaco digoxina, digoxigenina e digitoxina. Estes compostos são eficientes controladores de taquicardias ventriculares, mas com uma janela terapêutica estreita, bastando um pequeno aumento de dosagem acima do limite para se tornarem tóxicos, podendo

levar a óbito. A anticalina DigA16, construída pela PIERIS (www.pieris-ag.com), pode ser injetada intravenosa para capturar as moléculas digitálicas circulantes impedindo sua ação, de uma maneira mais eficiente que os tratamentos de desintoxicação e suporte utilizados atualmente (SCHLEHUBER et al., 2000; SCHLEHUBER; SKERRA, 2005).

O mercado de Biofármacos movimentou mais de US\$ 100 bilhões em 2010 com possibilidade de crescimento nos próximos anos. Expectativas projetam que em 2015 mais de 50% das drogas inovadoras aprovadas serão biofármacos e em 2025 este número aumentará mais de 75% (BERKOWITZ et al., 2012). Apenas no mercado norte-americano, no período de 1998 a 2012, do total de 162 novas moléculas que entraram no FDA como “*priority reviews*” (para tratamento de doenças graves que ameaçam a vida, ou, como uma alternativa para terapias já existentes, mas com significantes melhorias em segurança e eficácia), 89 (55%) vieram de companhias biotecnológicas e 73 (45%) da indústria farmacêutica (DRAKEMAN, 2014). Dados mostram que em 2013, apenas os 8 biofármacos mais comercializados mundialmente atingiram mais de US\$ 63 bilhões (LAWRENCE; LAHTEENMAKI, 2014).

O LOPAP, descoberto pelo grupo de pesquisadores do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, é uma proteína cujo estudo de sua ação tóxica auxiliou no entendimento do mecanismo de ação do envenenamento das vítimas, e também abriu possibilidades para outras importantes aplicações biotecnológicas, aproveitando a versatilidade de suas propriedades. Como foi detalhado, esta lipocalina tem ação na cascata de coagulação, seu mecanismo foi bem caracterizado e descrito como um ativador de protrombina, sendo a única lipocalina descrita com ação catalítica serino-protease (CARRIJO-CARVALHO; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2007; REIS et al., 1999). Também teve seu papel comprovado como modulador de processos celulares citoprotetores (CARRIJO-CARVALHO, 2009; CARRIJO-CARVALHO; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2007) e demonstrado em modelo animal que possui potencial como droga antagonista de heparina de baixo peso molecular, em alternativa ao sulfato de protamina (ANDRADE et al., 2012). Neste último trabalho também foi mencionado que os animais tratados com rLOPAP não apresentaram hipertermia, o que é um indicativo incipiente de boa tolerabilidade à proteína recombinante em um eventual uso como biofármaco.

2.4 Produção de Proteínas Heterólogas em *Pichia pastoris*

A necessidade de produção de proteínas com interesse biotecnológico ou terapêutico em grande quantidade, para atender as demandas de mercado sem depender de extração de fontes naturais, geralmente inviáveis economicamente, ou de qualidade inconstante, impulsionou pesquisadores nas últimas décadas para desenvolver formas de produção recombinante destas proteínas em cultura de microrganismos. Os avanços na pesquisa aconteceram gradativamente, desde a descoberta das enzimas de restrição e as ligases na década de 70, passando pela reação de polimerase em cadeia na década seguinte e ao aperfeiçoamento por engenharia genética de linhagens de bactérias e leveduras nos anos 90.

Insulina foi a primeira proteína terapêutica recombinante produzida comercialmente no final da década de 70, em bactéria *E. coli*, para substituição da extraída de pâncreas bovino e suíno ou a sintética, oferecendo maior segurança, qualidade e menor custo (KEEN et al., 1980). Posteriormente em 1987, Novo Nordisk liderou o mercado de insulina recombinante com seu produto Novolin® (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca), produzido em *S. cerevisiae*. Atualmente a produção de insulina recombinante em *S. cerevisiae* detém cerca de 50% do mercado enquanto Biocon, quarto produtor mundial de insulina, tem utilizado *P. pastoris*, a concentrações de 3 g/L de produto (MEEHL; STADHEIM, 2014).

Protocolos de cultivo de *P. pastoris* foram desenvolvidos inicialmente pela Phillips Petroleum Company para produção de proteína celular que iria compor ração animal, nos anos 70. A intenção da empresa era se aproveitar do baixo preço do metanol em um momento, entretanto, a crise do petróleo na mesma década elevou o preço deste álcool inviabilizando o projeto. No início dos anos 80 a empresa contratou o Salk Institute Biotechnology (www.salk.edu), para desenvolver a *P. pastoris* como organismo de expressão de proteínas heterólogas. O gene e promotor da álcool oxidase (AOX), principal enzima para metabolismo do metanol foram elucidados, e foram criados vetores, linhagens e protocolos para manipulação genética da *P. pastoris*. A combinação do desenvolvimento de cultivo com o as técnicas de manipulação genética resultaram em altos índices de produção de proteína. Atualmente a Invitrogen Corporation detém os direitos licenciados de comercialização dos componentes de expressão nas linhagens desenvolvidas (CEREHINO; CREGG, 2000).

As reações iniciais de assimilação do metanol acontecem no peroxissomo, que contem as três enzimas fundamentais que possibilitam esse metabolismo: a álcool oxidase (AOX), que converte metanol a formaldeído com formação de peróxido de hidrogênio; a catalase, que degrada este peróxido, espécie tóxica e extremamente reativa, em água e oxigênio; e a dihidroxiacetona sintase (DHAS), que condensa parte do formaldeído com xilulose-5-monofosfato, formando a dihidroxiacetona e gliceraldeído-3-fosfato, enquanto a outra parte deixa o peroxissomo e é convertida a formato e dióxido de carbono por dehidrogenases do citosol. Um esquema com estas etapas de catabolismo do metanol é visualizado na **Figura 09** (CEREGHINO; CREGG, 2000).

AOX e DHAS estão presentes em grande abundância em células de leveduras metilotróficas cultivadas com metanol como fonte de carbono (AOX responde por mais de 30% da proteína dissolvida), mas não quando são utilizadas outras fontes como glicose, glicerol ou etanol. Há dois genes que codificam AOX in *P. pastoris*: AOX1 e AOX2, sendo o primeiro responsável pela maior parte da expressão desta enzima. A expressão gênica de AOX1 é controlada ao nível de transcrição e a presença de metanol essencial para indução. O gene AOX2 produz 10-20 vezes menos enzima AOX do que o gene AOX1 (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

Existem três linhagens diferentes de *P. pastoris* quanto a assimilação de metanol. A linhagem Mut⁺, ou fenótipo rápido de utilização de metanol, cresce no metanol na proporção da linhagem nativa e necessita de grande alimentação de metanol em fermentações de larga escala. A linhagem Mut^s, ou fenótipo lento de utilização de metanol, tem uma interrupção no gene AOX1 e como as células dependem assim do gene AOX2, um crescimento lento e baixo metabolismo de metanol são apresentados. A linhagem Mut⁻, ou fenótipo negativo de utilização de metanol apresenta ambos os genes AOX1 e AOX2 deletados e não cresce em metanol, sendo utilizada para expressar algumas proteínas em casos específicos (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

Figura 09 - Catabolismo do metanol em *Pichia pastoris*.

Modificado de Cereghino e Cregg, 2000. **Legenda:** 1- álcool oxidase (AOX); 2- catalase; 3- formaldeído dehidrogenase; 4- formato dehidrogenase; 5- dihidroxiacetona sintase (DHAS); 6- dihidroxiacetona quinase (DHAK); 7- frutose 1,6-bisfosfato aldolase; 8- frutose 1,6-bisfosfatase; GAP- gliceraldeído-3-fosfato; DHA- dihidroxiacetona; X_5P - xilulose-5-monofosfato; FBP- frutose-1,6-bisfosfato; F_6P - frutose-6-fosfato; GSH- glutationa reduzida; $\text{GS-CH}_2\text{OH}$ - S-hidroximetilglutaciona.

A inserção de genes exógenos em *P. pastoris* passa por três etapas básicas: a inserção do gene em um vetor de expressão, a introdução do vetor de expressão dentro do genoma da *P. pastoris*, e a verificação da expressão da proteína. Um diagrama geral de um vetor de expressão é exibido na **Figura 10**.

Figura 10 - Diagrama geral de um vetor para *Pichia pastoris*.

Adaptado de Cereghino; Cregg, 2000. YFG = “seu gene favorito”; * = sítios para amplificação de cassete.

Os vetores de expressão utilizados foram desenhados como *Escherichia coli*/*P. pastoris* vetores de transporte com uma origem de replicação para manutenção do plasmídeo e marcadores funcionais para um ou ambos os organismos. Os melhores resultados de expressão são obtidos geralmente quando o primeiro ATG do código heterólogo é inserido em seguida ao ATG do promotor AOX1. Os marcadores existentes são os genes de via biossintética *HIS4* (codifica enzima histidinol dehidrogenase), *ARG4* (codifica enzima argininosuccinato liase) e *Sh ble* (confere resistência a zeocina), utilizados unicamente ou em conjunto em linhagens de *P. pastoris* mutantes auxotróficas em histidina ou arginina (CEREGHINO; CREGG, 2000), facilitando a seleção de células com êxito na inserção do gene de interesse.

A expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* cultivada em biorreatores pode atingir altas concentrações. As maiores concentrações reportadas são de 22 g.L⁻¹ para uma proteína intracelular e 11 g.L⁻¹ para uma proteína secretada. Uma etapa crucial na otimização de um sistema de expressão de proteína heteróloga é o controle do processo fermentativo, buscando altos títulos de concentração do

produto recombinante. Geralmente o processo consiste de três fases, como proposto pela Invitrogen em seu protocolo de produção: a primeira fase consiste de uma etapa de batelada e glicerol como fonte de carbono, aumentando a concentração celular rapidamente, mas sem expressar a proteína recombinante; quando o glicerol da fase de batelada acaba do sobrenadante uma fase de batelada alimentada com glicerol se inicia para atingir alta densidade; depois de parar a alimentação de glicerol por uma ou duas horas para eliminar toda a fonte de carbono do sobrenadante a terceira fase é iniciada com alimentação em metanol para induzir a expressão da proteína recombinante (GAO; SHI, 2013).

Observa-se que, apesar da existência de parâmetros preconizados pelo fabricante das linhagens, estes não podem ser assumidos como uma condição padrão de produção. Pesquisadores têm reportado alterações para melhorar o rendimento ou a manutenção das características da proteína recombinante expressa (atividade, conformação estrutural, solubilidade, outras). As mudanças ocorrem em um ou mais itens, simultaneamente, desde mudanças na composição do meio variando a fonte de nitrogênio (orgânica ou inorgânica), nas temperaturas da fase de crescimento em glicerol e de expressão em metanol, no pH do meio ao longo do ensaio, na concentração de oxigênio dissolvido ou de metanol na fase de expressão (ECKART; BUSSINEAU, 1996; GAO; SHI, 2013; HONG et al., 2011).

A levedura *Pichia pastoris* apresenta ainda a vantagem de realizar algumas modificações pós-translacionais, comuns de eucarioto superior, tais como enovelamento correto, formação de pontes dissulfeto, glicosilações e processamento de sequências sinais, para direcionar as proteínas para receptores específicos (MACAULEY-PATRICK et al, 2005).

Glicosilação é a ligação covalente de monossacarídeos ou cadeias de açúcares (oligossacarídeos) a proteínas, por ligações N-glicosídicas ou O-glicosídicas. As N-glicosilações podem ocorrer nos resíduos de asparagina que estão alinhados na estrutura primária da proteína em uma sequência específica N-X-S/T, onde N é um resíduo de asparagina, X é um resíduo de aminoácido qualquer diferente de prolina ou ácido aspártico, e S/T é um resíduo de serina ou treonina. O-glicosilações ocorrem em resíduos de serina ou treonina, sem a necessidade de um alinhamento específico com outros resíduos de aminoácidos. Enquanto as cadeias glicosídicas das N-glicosilações começam a se formar no citosol, são transferidas para a proteína no lúmen do retículo endoplasmático e são finalizadas no aparelho

de Golgi, pela ação de diversas enzimas glicosídicas, as O-glicosilações ocorrem exclusivamente no Golgi. Glicosilações são também conhecidas como modificações pós-translacionais.

Segundo Cereghino e Cregg (2000), *P. pastoris* expressa proteínas heterólogas tipicamente com muitos resíduos de manose, do tipo oligomanose, que dependendo da finalidade de uso da proteína pode ser um fator limitante, como para produtos terapêuticos, que com um padrão diferente do humano em glicosilação podem causar reações alérgicas ou imunes (ECKART; BUSSINEAU, 1996).

A enzima oligossacaril transferase (OST) faz o transporte do grupo glicosídico formado, ligado covalentemente a uma proteína lipídica transmembranar do retículo endoplasmático, o dolicol difosfato, para a asparagina reconhecida em alinhamento N-X-S/T, na fita peptídica sintetizada. A **Figura 11** esquematiza minimamente essa transferência, onde o oligossacarídeo ilustrado é o $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Glc = glicose, Mn = manose e GlcNAc = N-acetilglicosamina), uma estrutura inicial de 14 açúcares comum a todas as N-glicosilações. A presença de prolina ou ácido aspártico em “X”, aminoácidos que possuem grupos volumosos como cadeia lateral, impede o acesso da enzima OST para executar essa transferência.

Figura 11 - Esquema de formação de N-glicosilação na proteína.

Na etapa seguinte, a proteína é transportada em vesículas que se fundem na porção *cis* do Golgi, onde enzimas retiram e também adicionam açúcares ao oligossacarídeo, diversificando a estrutura final. Além do tipo oligomanose, outras duas classificações ocorrem nas N-glicosilações, o tipo complexo e o híbrido, mostrados na **Figura 12**. O processo de diferenciação estrutural ocorre durante a transição da proteína pelas porções *cis*, *medial* e *trans* do Golgi, e simultaneamente às outras modificações proteicas que estão ocorrendo, como enovelamento, formação de pontes dissulfeto, e outras. Trabalhos postulam que glicosilações são importantes intermediadores no processo de enovelamento das proteínas em eucariotos e também estão envolvidas na estabilidade térmica (MEYNIAL-SALLES; COMBES, 1996; WANG et al., 1996).

Figura 12 - Estruturas finais comuns em N-glicosilação.

Alguns antibióticos naturais, como anfomicina, tsushimicina, showdomicina, podem interferir com o processo de N-glicosilação, impedindo a formação de precursores do dolicol. A tunicamicina, um antibiótico glicosídico produzido por bactérias do gênero *Streptomyces*, inibe uma enzima responsável pela fosforilação do dolicol, de monofosfato para difosfato, a GPT (GlcNac-1-fosfato translocase), que catalisa a transferência do grupo GlcNac-1-fosfato da UDP-GlcNac (uracil-difosfato-glicose-N-acetil) para a proteína transmembranar dolicol monofosfato, interrompendo toda a síntese de N-glicosilações da célula (WYSZYŃSKI, 2010). Estes inibidores são muito utilizados para estudos das influências dos oligoglicosídeos nas proteínas.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral:

- produzir rLOPAP em biorreator de 10 L, a partir de sistema de expressão em levedura *Pichia pastoris* recombinante, e purificar a proteína por FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*), com protocolos já utilizados para esta escala de produção.

Objetivos específicos:

- avaliar a presença de N-glicosilações no r-LOPAP expresso, realizando uma outra produção sob condições idênticas, exceto pela adição de um inibidor durante a fase de expressão da proteína;
- caracterizar os lotes de rLOPAP obtidos empregando: 1- confirmação de tamanho molecular por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida); 2- atividade enzimática (hidrólise de protrombina); e 3- atividade citoprotetora em células do endotélio de cordão umbilical humano (HUVEC);
- analisar a estrutura secundária empregando dicroísmo circular (CD).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As principais atividades realizadas neste trabalho estão esquematizadas na **Figura 13**.

Figura 13 - Atividades realizadas.

* Amostra referência Butantan = sobrenadante com rLOPAP, expresso na mesma linhagem mutante de *P. pastoris* utilizada nos ensaios, dialisado, fornecido pelo I. Butantan.

4.1 Materiais

4.1.1 Modificação da levedura para expressão de rLOPAP

O clone de *Pichia pastoris* para expressão da proteína recombinante foi construído no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan pela Dr.^a Linda Christian Carrijo-Carvalho, em seu doutorado sob a orientação da Dr.^a Ana Marisa Chudzinski-Tavassi, no período de 2004 a 2009, e está descrito em detalhes em sua tese (CARRIJO-CARVALHO, 2009). Foram utilizados a linhagem *P. pastoris* GS115:his4, Mut⁺ e o plasmídeo pPIC9K (*Pichia Vector for Multicopy Integration and Secreted Expression*), para expressão da proteína secretada no meio extracelular, ambos fornecidos pela Invitrogen (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, EUA).

Resumidamente as etapas de transformação da linhagem de *P. pastoris*, realizadas pela Dr.^a Carrijo-Carvalho incluíram: amplificação do inserto de cDNA codificador para LOPAP de uma biblioteca de cDNA das cerdas da lagarta *L.obliqua* feita por Reis (2002), por PCR, utilizando como primer o oligonucleotídeo N-terminal da proteína acrescido do sítio de restrição Sna BI; purificação do DNA obtido, ligação no plasmídeo pGEM-T easy® (Promega, Madison, Wiscosin, EUA), que foi inserido em *Escherichia coli* DH5α por choque térmico (INOUE, 1990). Após cultivo seletivo em meios e placas LB/ampicilina e LB/kanamicina, seus plasmídeos foram extraídos e purificados com o kit mini-prep Wizard plus SVTM (Promega®), digeridos com enzima Sna BI, purificados por SDS-PAGE e extraídos do gel com kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System™ (Promega®), obtendo-se assim quantidade suficiente do DNA codificador para LOPAP com extremidade de ligação coesiva Sna BI, que foi incubada com o plasmídeo pPIC9K para ligação. O plasmídeo pPIC9K-LOPAP foi amplificado e purificado, repetindo as etapas do plasmídeo pGEM-T easy® acima descritas.

Após controle de qualidade dos plasmídeos obtidos quanto ao tamanho do inserto, estes foram linearizados e inseridos na levedura *P. pastoris* por processo de eletroporação, após o qual alíquotas foram estriadas em placas com meio mínimo de dextrose (MD), sem suplementação de histidina, de forma que apenas as células mutantes cresceram. A eficiência do processo foi verificada cultivando a levedura em shaker e feitos testes para comprovar a expressão do rLOPAP e as células que apresentaram maior expressão foram armazenadas.

4.1.2 Meios de cultura

A) BMGY (*Buffered Glycerol-Complex Medium*) ou BMMY (*Buffered Methanol-Complex Medium*) (1 L)

1. Dissolver 10 g de extrato de levedura e 20 g de peptona em 700 mL de água.
2. Autoclavar por 20 min no ciclo líquido a 121 °C e resfriar.
3. Adicionar:
100 mL de solução estéril tampão fosfato de potássio 1 mol/L pH 6.0
100 mL de solução do meio comercial YNB 13,4% esterilizada por filtração
2 mL de solução de biotina 0,02% esterilizada por filtração
4. Para BMGY, adicionar 100 mL de solução estéril de glicerol 10%.
5. Para BMMY, adicionar 100 mL de solução metanol 5% esterilizada por filtração.

B) BMG (*Buffered Minimal Glycerol*) ou BMM (*Buffered Minimal Methanol*) (1 L)

Preparar seguindo o procedimento anterior sem acrescentar extrato de levedura e peptona. Utilizar pH 5.0 para a solução tampão fosfato de potássio 1M.

C) YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose medium*) (1 L)

1. Dissolver 10 g de extrato de levedura e 20 g de peptona em 900 mL de água.
2. Autoclavar por 20 min no ciclo líquido a 121 °C e resfriar.
3. Adicionar 100 mL de solução estéril glicose 20%.

D) Meio basal de sais para fermentação (1 L)

1. Dissolver em 800 mL de água:
26,7 mL ácido fosfórico 85%
0,93 g sulfato de cálcio
18,2 g sulfato de potássio
14,9 g sulfato de magnésio.7 H₂O
4,13 g hidróxido de potássio
40,0 g glicerol
2. Completar com água q.s.p. 1 L e esterilizar no biorreator.

E) Solução de traços PTM1 (*Pichia Trace Metal*) (1 L)

1. Dissolver em 800 mL de água, nesta ordem:

6,0 g sulfato de cobre. 5 H₂O

0,08 g iodeto de sódio

3,0 g sulfato de manganês. H₂O

0,2 g molibdato de sódio. 2 H₂O

0,02 g ácido bórico

0,5 g cloreto de cobalto

20,0 g cloreto de zinco

65,0 g sulfato ferroso. 7 H₂O

0,2 g biotina

5,0 mL ácido sulfúrico

2. Completar com água q.s.p. 1 L e filtrar esterilizando. Estocar à temperatura ambiente.

4.2 Métodos

4.2.1 Ensaaios em agitador rotativo

Os ensaios seguiram os procedimentos descritos no protocolo *Pichia Expression Kit User Manual*, catálogo K1710-01, PN 25-0043, revisão 07/09/2010 (Invitrogen).

Duas alíquotas de 50 µL de *P. pastoris* recombinante para expressar LOPAP, provenientes do banco mantido no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, foram inoculadas em 4 erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio BMGY que foram deixados em agitador rotativo (Tecnal TE 420), com agitação de 260 rpm e na temperatura de 30 °C por 48 h de crescimento. Quando atingiram uma DO_{600nm} entre 2 e 6 foram centrifugados à 338 g por 5 min em centrífuga (Hitachi Himac CR 22GII) à temperatura ambiente, coletando-se o *pellet* de células e desprezando o sobrenadante. As células foram suspensas em meio BMMY até DO_{600nm} igual a 1 e separadas em 4 alíquotas de 50 mL em erlenmeyers de 250 mL, deixados em cultivo sob agitação à 260 rpm, na temperatura de 24 °C, com adição de metanol 100% q.s.p. 0,25% v/v, a cada 12 h, durante 84 h de tempo total de

cultivo. Ao término o sobrenadante foi separado por centrifugação e estocado a -80 °C.

Outras 2 alíquotas de 50 µL do mesmo banco destinaram-se à verificação da expressão do rLOPAP na presença de tunicamicina, um antibiótico glicosídico de *Streptomyces sp*, inibidor de glicosilação (N-glicosilação). Foi feito o mesmo procedimento descrito no parágrafo anterior, seguindo as mesmas condições de quantidade de inóculo, temperaturas, agitação e tempo de ensaio, porém com uma modificação: aos meios BMGY e BMMY, adicionou-se volume de uma solução estéril 1 mg de tunicamicina em NaOH 0,1 mol/L até a concentração de 15 µg de tunicamicina / mL de meio, nas condições de Riley et al. (2002).

Nos ensaios em agitador rotativo foram acompanhados a DO_{600nm}, pH nas amostragens, cinética enzimática e SDS-PAGE do sobrenadante total ao fim do ensaio.

4.2.2 Produção de rLOPAP em biorreator

Foram feitos 3 ensaios de alta densidade celular em biorreator de 10 L para obter rLopap em maior quantidade. O protocolo de produção foi baseado no manual Invitrogen (*Pichia Fermentation Process Guidelines, version B 053002*) e em Carrijo-Carvalho (2009).

4.2.2.1 Preparo do banco de trabalho

Uma alíquota de 50 µL de *P. pastoris* recombinante para expressão de LOPAP, do banco do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, foi utilizada para crescimento em meio YPD em 2 erlenmeyers de 500 mL com 100mL de meio cada, sob agitação de 260 rpm e temperatura de 30 °C. Após 48 h, os volumes dos dois erlenmeyers foram juntados, centrifugados a 338 g por 5 min em centrífuga refrigerada a 4°. O sobrenadante foi desprezado e o pellet de células foi suspenso em glicerol 20% estéril, em quantidade suficiente para atingir uma DO_{600nm} entre 50 e 100, para depois ser separado em alíquotas de 1 mL e estocadas a -80 °C. Estas alíquotas foram utilizadas como banco de trabalho.

4.2.2.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado com 8 alíquotas de 100 µL do banco de trabalho (ver **4.2.2.1**), que foram inoculadas em 8 erlenmeyers de 1.000 mL contendo cada um 100 mL de meio BMG preparado como descrito em **4.1.2 B**. Os frascos foram colocados em agitador rotativo (New Brunswick G-25) com temperatura de 30 °C e a 300 rpm, por 48 h. Após este período de crescimento, os cultivos foram somados e homogeneizados e uma alíquota de 350 mL foi tomada como inóculo para cada um dos biorreatores (10% do volume de partida do biorreator).

4.2.2.3 Preparo do biorreator

Os biorreatores (Biostat C Plus 10 L Sartorius Stedim Biotech com *software* de controle MFCS/DA Win-system) foram esterilizados contendo 3.150 mL de meio de sais basais de fermentação (**4.1.2 D**), à agitação de 300 rpm. Após resfriamento até 30 °C, foi adicionado hidróxido de amônio 50% em quantidade suficiente para acertar o pH do meio em 5,0. Com o pH ajustado, foram adicionados 16,63 mL de solução PTM 1 (*Pichia Trace Metal*, **4.1.2 E**), na proporção de 4,75 mL/ L de partida do biorreator. Depois de calibradas as sondas de oxigênio, os biorreatores receberam os inóculos.

4.2.2.4 Ensaio com inibidor de glicosilação

No ensaio denominado Ensaio 2, foi adicionado no tempo de 20 h de cultivo, final da fase de *batch* com glicerol, 100 mL de uma solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L contendo 15 mg de tunicamicina, um inibidor de N-glicosilações, para uma concentração final de ensaio de 2,5 µg/mL, conforme Arjmand et al. (2011). Após 15 min de homogeneização no meio, foi iniciado o *fed-batch* com metanol.

4.2.2.5 Parâmetros controlados durante os ensaios

Os biorreatores providos de *software* MFCS/DA Win-system monitoraram ao longo de todo o ensaio as variáveis de temperatura, pH, agitação, oxigênio dissolvido (DO), aeração (L/min), volumes consumidos totais de base (NH₄OH 50%), de ácido (H₂SO₄ 2 mol/L) e de antiespumante KFO 673TM, (Emerald, Cuyahoga

Falls, Oklahoma, EUA). Foram realizados ainda os seguintes controles externos adicionais: % de CO₂ e de O₂ nos gases expelidos do biorreator, por analisador de gases, e biomassa seca, DO_{600nm}, dosagem de metanol e de glicerol no meio do biorreator a partir da biomassa e do filtrado obtidos de alíquotas de cerca de 20 mL retiradas ao longo do ensaio, centrifugadas a 15.000 g por 10 min em centrífuga a 4 °C e filtradas em membrana 0,22 µm de tamanho de poro.

As condições de manutenção do cultivo foram temperatura em 30 °C durante o crescimento com glicerol como fonte de carbono e 26 °C na alimentação com metanol. A agitação e a aeração foram aumentadas gradativamente, à medida que se aumentava a população de células e consequentemente, a respiração e a demanda por oxigênio dissolvido, que foi mantida sempre acima de 20% ao longo de todo o ensaio. O pH foi mantido em 5,0 com a adição de NH₄OH 50%, que também serviu como fonte de nitrogênio para o crescimento celular.

4.2.3 Separação do sobrenadante

Todas as produções dos 3 ensaios em biorreator foram separadas em alíquotas de 200 mL e centrifugados a 15.000 g, em centrífuga refrigerada (Hitachi Himac CR 22GII) a 4 °C, por 10 min. Os sobrenadantes foram filtrados gelados sobre pressão positiva em conjunto de filtração de alta pressão em aço inoxidável, com membrana CUNO Zeta Plus® 90S (3M, Diegem, Bélgica), que possui faixa de abertura de malha na ordem de < 0,1 µm à < 0,3 µm para retenção mecânica e carregada com cargas positivas intrínsecas para adsorção eletrocinética de espécies negativas. Os sobrenadantes filtrados foram estocados a -20 °C em frascos de 500 mL. Partes das biomassas também foram armazenadas nas mesmas condições.

4.2.4 Diafiltração

Alíquotas de 500 mL dos sobrenadantes estocados foram diafiltradas em membrana de filtração tangencial Biomax 10® Pellicon XL PXB0 10A 50 (Millipore Billerica, Massachusetts, EUA) acoplada ao equipamento de diafiltração LabScale Millipore. A diálise foi feita com tampão Tris-HCl 20.10⁻³ mol/L pH 7,1 com 150.10⁻³ mol/L NaCl, sob refrigeração externa a 7 °C, ao fluxo de 2,0 mL / min. O volume de tampão utilizado foi quatro vezes o volume da alíquota dialisada (500 mL de alíquota

e 2000 mL de tampão). Ao fim da diálise as alíquotas foram concentradas no mesmo equipamento para um volume de 200 mL e estocadas a -20 °C.

4.2.5 Purificação do rLOPAP

O rLOPAP expresso foi purificado em colaboração com a Dr^a. Juliana Mozer Sciani do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do I. Butantan, em 2 etapas de cromatografia preparativa conforme estabelecido em Carrijo-Carvalho (2009). Foi utilizado nestas 2 etapas sistema de cromatografia preparativa Äkta Purifier com coletor automático Frac P950 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido)

4.2.5.1 Cromatografia de troca iônica

Alíquotas de 20 mL do meio diafiltrado foram injetadas em coluna Hiprep 16/10 (20 mL) Q Sepharose Fast Flow (QFF) GE Healthcare, e eluídas com 100 mL de tampão de equilíbrio Tris-HCl $20 \cdot 10^{-3}$ mol/L pH 7,3 com $150 \cdot 10^{-3}$ mol/L NaCl ao fluxo de 5 mL.min⁻¹, seguida de mais 100 mL de tampão de eluição Tris-HCl $20 \cdot 10^{-3}$ mol/L pH 7,3 com NaCl 1 mol/L. Frações de 10 mL foram coletadas separadamente ao longo de toda a corrida, identificando as que continham a proteína de interesse por teste de atividade enzimática (ver 4.2.6). Estas frações com atividade enzimática, resultantes da injeção de várias alíquotas de 20 mL, foram juntadas em um pool e concentradas por centrifugação em tubo Amicon® Millipore 10 kDa, com ciclos de 4.300 g por 10 min, em centrífuga Eppendorf 5810 R climatizada a 4 °C, até se obter uma concentração de proteínas em torno de 200 µg/mL, dosadas conforme Bradford (1976) (ver 4.2.7).

4.2.5.2 Cromatografia de gel filtração

O *pool* concentrado de frações da primeira cromatografia foi injetado novamente em frações de 30 mL em coluna de gel filtração Sephacryl S200 GE Healthcare, eluídas com tampão Tris-HCl $20 \cdot 10^{-3}$ mol/L pH 7,3 com $150 \cdot 10^{-3}$ mol/L NaCl, no fluxo de 1 mL / min. Foram coletadas frações de 10 mL que foram submetidas a teste de cinética enzimática para localizar as frações que continham o rLOPAP (ver 4.2.6). Estas frações foram concentradas da mesma forma que na cromatografia de troca iônica.

4.2.6 Atividade enzimática com substrato cromogênico S-2238

O rLOPAP expresso nos meios foi testado quanto à sua atividade enzimática de clivar a protrombina em trombina, conforme descrito por Reis et al. (2001b) e Carrijo-Carvalho (2009).

O acompanhamento deste parâmetro dá-se por medição indireta. Aliquotas de 100 µL do meio de cultivo são incubadas por 20 min a 37 °C com 72 µL de tampão Tris-HCL $20 \cdot 10^{-3}$ mol/L pH 7,3 NaCl 0,1 mol/L, mais 20 µL de CaCl_2 $20 \cdot 10^{-3}$ mol/L, 3 µL de protrombina 90 p.mol/L Calbiochem® (Millipore) e 5 µL de substrato S-2238 40 µ.mol/L (Chromogenix, Milano, Itália), totalizando um volume de 200 µL em poços de placas 96 well. A cada 1 min o espectrofotômetro (SpectraMax 190 Molecular Devices) faz uma leitura de absorção no comprimento de onda de 405 nm de cada poço com amostra. Nos poços onde existe concentração de rLOPAP, este cliva a protrombina em trombina, que por sua vez cliva o substrato S-2238, deixando a forma p-nitroanilina livre, formando uma coloração amarelo claro, responsável pelo aumento de absorção neste comprimento de onda. Esse aumento ao longo do tempo forma uma curva típica de cinética de atividade e pode ser utilizada para identificar por comparação as amostras com maior concentração de rLOPAP ativa. Como controles negativos adicionam-se todos os reagentes menos a amostra e todos os reagentes menos a protrombina. Arbitariamente assumiu-se que 1 U = 1 m.Ab (*mili unidade de absorbância / min*) para este teste.

4.2.7 Dosagem de proteínas por Bradford

As frações de algumas etapas de purificação tiveram seu conteúdo protéico determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando reagente comercial Bradford Bio-Rad e como padrão albumina bovina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA). A reação foi feita em tubos de ensaio adicionando 33,4 µL de amostra ou solução padrão de albumina e 1000 µL de reagente de Bradford. Os tubos foram agitados em agitador de tubos e deixados em repouso por 30 min, após transcorrido o tempo, os conteúdos são transferidos para cubetas de plástico estreitas de 1 mL e as absorções à 595 nm são lidas em espectrofotômetro Hitachi U-2000. O resultado de concentração se obtém por padronização externa com uma curva de albumina na faixa de concentração de 0,1 a 1,4 mg / mL.

4.2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Algumas etapas da produção e purificação do rLOPAP foram analisadas em gel de eletroforese (LAEMMLI, 1970) com o surfactante denaturante SDS (dodecil sulfato de sódio) para visualização das bandas proteicas. As condições foram concentrações de acrilamida de 12,5% para gel de corrida e 5,0% para gel de empilhamento, com espaçador de 1 mm, voltagem fixada em 17 mA por gel. Os géis foram corados com solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 ou por solução de nitrato de prata. As proteínas que compõem o padrão utilizado (*Low Mol Weight Calib for SDS Electrophoresis* / Amershan Bio® GE Healthcare) foram fosforilase *mw* 97 kDa, albumina *mw* 66 kDa, ovalbumina *mw* 45 kDa, anidrase carbônica *mw* 30 kDa, inibidor de tripsina *mw* 20,1 kDa e α -lactoalbumina *mw* 14,4 kDa (MORRISSEY, 1982).

4.2.9 Avaliação da atividade citoprotetora do rLOPAP

Este teste foi realizado em colaboração com a Dr^a. Linda Christian Carrijo-Carvalho e pela doutoranda Cicília Carvalho do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do I. Butantan, em células HUVEC cedidas pela Dra. Patrícia Léo e pela doutoranda Claudia Arantes M. Anacleto, do Laboratório de Biotecnologia Industrial do IPT. O teste foi realizado como descrito em Carrijo-Carvalho (2009).

A viabilidade celular é avaliada pelo teste colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), um sal que é reduzido de monotetrazolium a formazan por mitocôndrias ativas em células vivas. O MTT se incorpora nas células viáveis, formando cristais de formazan, os quais são dissolvidos por dimetilsulfóxido (DMSO) e são detectados colorimetricamente por absorção no comprimento de onda de 550 nm.

As células foram cultivadas em três condições diferentes: como *controle positivo* recebem meio DMEM *high glucose* (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), como *controle negativo* recebem meio RPMI suplementado com 1% de SFB (uma condição apoptótica), e como condição de ensaio recebem meio RPMI suplementado com 1% de SFB e 10 μ g de rLOPAP / mL de meio. As células são mantidas em estufa com 5% de CO₂ e 37 °C por 48 h. O resultado é analisado estatisticamente (ANOVA) com 95% de intervalo de confiança.

4.2.10 Análise de dicroísmo circular (CD) do rLOPAP purificado

Este teste foi feito em colaboração com o Dr. Leonardo Kobashi e Dr. Enéas de Carvalho, do Centro de Biotecnologia do I. Butantan.

As frações de proteína obtidas na segunda etapa de cromatografia e concentradas por centrifugação em tubo Amicon® Millipore 10 kDa a 4.300 g por 10 min em centrífuga Eppendorf 580R refrigerada a 4 °C, foram lavadas após a concentração com 15 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L e pH 7,1, por 3 vezes, no mesmo procedimento de ultracentrifugação, para retirar o íon cloreto do meio que interfere na análise de CD. Após, 450 µL desta solução final foram analisados em espectropolarímetro Jasco J810, à temperatura de 20 °C e em atmosfera saturada de nitrogênio. A faixa do espectro medida no ensaio oscilou de 190 à 260 nm e foi expressa com a média de cinco leituras realizadas. Os dados obtidos foram tratados por ferramenta de software online Dichroweb, utilizando o algoritmo de cálculo “K2d” e comprimentos de onda mínimo e máximo adquiridos para cada proteína (WITHMORE; WALLACE, 2004 e 2007).

5 RESULTADOS

Os objetivos principais deste trabalho foram a produção em biorreator de rLOPAP, expresso em cultura da levedura *P. pastoris*; obtenção de quantidade suficiente de meio sobrenadante para fazer o *downstream*, purificação da proteína de interesse e caracterização quanto a suas propriedades estrutural, enzimática e biológica. Avaliou-se também a proteína rLOPAP expressa em cultivo com tunicamicina, um inibidor de N-glicosilação.

Nesse aspecto e antes de partir para o cultivo em biorreator, buscou-se repetir o controle que o I. Butantan realizou com os clones fornecidos quanto a expressão de LOPAP, realizando cultivo em agitador rotativo.

A linhagem de *Pichia pastoris* GS115:*his4*, Mut⁺ (Invitrogen) tem deficiência no gene *his4*, que codifica a histidinol dehidrogenase, impedindo-a assim de sintetizar histidina. O gene *his4* deletado está inserido no plasmídeo pPIC9K (Invitrogen) utilizado para construção do mutante. O crescimento apresentado no meio BMGY (sem suplemento de histidina) foi uma indicação preliminar que as células do banco continham o inserto de plasmídeo (em t= 0 h / DO_{600nm}= 0,17 Ab; em t= 32 h / DO_{600nm}= 3,6 Ab). Na **Figura 14 (A)**, uma imagem do cultivo em BMGY pode ser vista.

No mesmo ensaio foi feito a expressão da proteína em presença de tunicamicina na concentração de 2,5 µg/mL de meio. A linhagem cresceu muito pouco no meio BMGY com tunicamicina, que tem glicerol como fonte de C, (t= 0 h / DO_{600nm}= 0,15 Ab; t= 48 h / DO_{600nm}= 0,54 Ab). Comparativamente, a linhagem cresceu bem no meio BMMY com tunicamicina, que tem metanol como fonte de carbono (t= 0 h / DO_{600nm}= 0,9 Ab / t= 36 h / DO_{600nm}= 9,9 Ab). NA **Figura 14, (B)** ilustra o cultivo em BMMY, com e sem tunicamicina, e **(C)** em detalhe, uma alíquota centrifugada com biomassa separada.

Foram feitas as dosagens de atividade enzimática (**Figuras 15, 16 e 17**), realizadas como descrito em 4.2.6, com o sobrenadante destes cultivos com e sem tunicamicina em agitador rotativo. Não foi observada nenhuma tendência correspondente a atividade enzimática, no resultado do teste com as amostras do cultivo com tunicamicina (**Figura 17**). Nas amostras cultivadas sem tunicamicina, observou-se no resultado uma pequena ascendência positiva, embora em uma

variação muito pequena, mas correspondente a uma cinética de atividade enzimática (**Figura 16**). Como controle positivo para o teste de atividade enzimática foi utilizado um rLOPAP purificado de sobrenadante de biorreator, produzido a partir desta mesma linhagem recombinante de *P. pastoris* no IPT, em 2006, e caracterizado no I. Butantan, denominado aqui como “rLopap Butantan”.

Foi feita análise em gel SDS-PAGE dos sobrenadantes dos cultivos em agitador rotativo, para verificação da expressão do rLOPAP nos meios com glicerol e com metanol, e comparação das bandas de rLOPAP dos cultivos com e sem tunicamicina. Não foram observadas bandas com massa molecular correspondente ao LOPAP, na altura do padrão de $mw=20$ kDa, nos poços onde foram colocadas as amostras de sobrenadante dos erlenmeyers cultivados com BMGY (glicerol como fonte de carbono), porém estão bem visíveis nos poços correspondentes aos cultivados com BMMY e BMMY + tunicamicina (metanol como fonte de carbono), como visualizado na **Figura 18**.

Figura 14 - Cultivo em agitador rotativo do clone de *P. pastoris* para expressar LOPAP recombinante.

Legenda: A- 48 h de cultivo em meio BMGY a 30 °C; B- 84 h de cultivo em meio BMMY; C- Aliquota 1 mL do cultivo em meio BMMY (84 h), após centrifugação.

Figura 15 - Atividade enzimática do rLOPAP produzido em agitador rotativo, com e sem tunicamicina, e controle positivo.

Figura 16 - Atividade enzimática do rLOPAP produzido em agitador rotativo, sem tunicamicina.

Figura 17 - Atividade enzimática do rLOPAP produzido em agitador rotativo, com tunicamicina.

Figura 18 - Gel de SDS-PAGE do sobrenadante de cultivo em agitador rotativo.

Legenda: 1- Padrão (kDa de cima para baixo = 97; 66; 45; 30; 20,1; 15); 2- Vazio; 3, 4, 5 e 6- 48h de cultivo com glicerol; 8 e 9- 84h de cultivo com metanol; 10 e 11- 84h de cultivo com metanol e adição de tunicamicina; 12- vazio; 13- 48h de cultivo com glicerol reduzido com mercaptoetanol; 14- vazio; 15- 84 h de cultivo com metanol e tunicamicina, reduzido com mercaptoetanol. Banda do rLOPAP em 20 kDa, indicada com seta.

O valor de DO_{600nm} do inóculo nos ensaios 1 e 2 em biorreator, foi de 15,8 AU. Foi feita lâmina de coloração de Gram para pesquisa de outros microrganismos por morfologia e não foi encontrado nenhum indicativo de contaminação. Os ensaios passaram por 3 fases, uma inicial de *batch* que contou com o glicerol esterilizado no biorreator como fonte inicial de carbono para crescimento e adaptação da levedura às condições no biorreator, aumentando a biomassa. Esta fase durou de 19 à 20 h.

A fase intermediária foi de *fed-batch* de glicerol e serviu para aumentar um pouco a população celular, em cultivo limitado em substrato. A alimentação iniciada nesta fase foi de aproximadamente 40,0 g de glicerol. h^{-1} (para 3,5 L de volume de partida) de uma solução 50% de glicerol, com adição de 12 mL de solução PTM1 / L de glicerol alimentado. Esta fase durou de 3 a 5 h, e foi importante para verificar o momento exato de término do glicerol quando a DO subiu rapidamente para valores próximos de 100% de oxigênio dissolvido, para iniciar a alimentação com metanol.

A última fase foi a de *fed-batch* de metanol. Nesta fase ocorreu a expressão da proteína recombinante. Foram utilizados 2,5 L de metanol 100% como fonte de carbono acrescido de 12 mL de solução PTM1 / L. A alimentação inicial foi de 9,95 $g.h^{-1}$ (para 3,5 L de volume de partida) durante cerca de 5 h, subindo para 20,2 $g.h^{-1}$ posteriormente, mantida por 3 h, passando finalmente para cerca de 30 $g.h^{-1}$, valor que se procurou manter até o término do ensaio, ocorrido de 86 a 120 h após. Essa alimentação precisou ser intermitentemente interrompida a partir de cerca de 56 h de tempo de cultivo, por conta da agitação e da aeração (1.700 rpm e 12,5%, respectivamente) se aproximarem dos valores limites do equipamento, e mesmo assim, foram insuficientes para manter o OD acima de 20%, frente a um cultivo com de $X = 103 g.L^{-1}$ de massa seca nesta etapa, atingindo ao término de 120 à 137 $g.L^{-1}$ de massa seca. A **Figura 19** apresenta uma imagem dos biorreatores utilizados durante o ensaio.

Figura 19 - Biorreatores utilizados durante os ensaios.

No ensaio 1, o volume final total foi de 4.200 mL (2.520 mL de sobrenadante e 1.606,0 g de biomassa) e houve sobra de 175 mL de metanol não consumidos. No ensaio 2 (com tunicamicina), o volume final total foi de 4.700 mL (2.900 mL de sobrenadante e 1.607,2 g de biomassa) e houve sobra de 170 mL de metanol não consumidos. No ensaio 3, o volume final total foi de 4.800 mL (3.040 mL de meio e 2.182,0 g de biomassa) e todo o metanol foi consumido. Não foram somados os volumes e massas das retiradas de amostras para acompanhamento do ensaio.

A dosagem de proteínas totais, por Bradford, nos sobrenadantes do final dos ensaios, resultou em: 0,73 mg/mL no ensaio 1; 0,76 mg/mL no ensaio 2; e 0,92 mg/mL no ensaio 3.

As **Figuras 20, 21 e 22** apresentam as curvas de biomassa seca X (g/L) e de DO_{600nm} das amostragens de acompanhamento dos três ensaios em biorreator. O monitoramento da temperatura no biorreator, para cada ensaio, pode ser vistas nas **Figuras 23, 24 e 25**.

Figura 20 - Ensaio 1: crescimento celular por X (g/L) e DO_{600nm} (Ab).

Figura 21 - Ensaio 2: crescimento celular por X (g/L) e DO_{600nm} (Ab).

Figura 22 - Ensaio 3: crescimento celular por X (g/L) e DO_{600nm} (Ab).

Figura 23 - Monitoramento da temperatura no biorreator durante o ensaio 1.

Figura 24 - Monitoramento da temperatura no biorreator durante o ensaio 2.

Figura 25 - Monitoramento da temperatura no biorreator durante o ensaio 3.

Foram analisadas as atividades enzimáticas em várias amostragens de sobrenadante coletadas ao longo dos ensaios 1 e 2 (**Figuras 26, 27 e 28**). Para o ensaio 3, foi analisado apenas a amostragem do término do ensaio (**Figura 29**). Nestas análises, foi utilizado como padrão positivo de atividade enzimática o rLOPAP Butantan. Nenhuma das amostras dos ensaios apresentou atividade enzimática ou ascendência positiva nos resultados gráficos, o que poderia corresponder a uma cinética enzimática, como foi verificado no resultado de atividade enzimática do sobrenadante do cultivo em agitador rotativo, sem tunicamicina (**Figura 15**).

Figura 26 - Atividade enzimática de vários pontos de amostragens coletadas ao longo dos ensaios 1 e 2.

Figura 27 - Atividade enzimática apenas de pontos de amostragens coletadas ao longo dos ensaios 1, sem tunicamicina. Sem plotar controle positivo.

Figura 28 - Atividade enzimática apenas de pontos de amostragens coletadas ao longo dos ensaios 2, com tunicamicina. Sem plotar controle positivo.

Figura 29 - Atividade enzimática rLOPAP Butantan (A) e amostragem do término do ensaio 3 (B).

Alíquotas dos sobrenadantes dos ensaios produzidos em agitador rotativo e em biorreator, e amostras de biomassa dos ensaios nos biorreatores, foram reagidas com anticorpo policlonal Anti-LOPAP, em teste DotBlot. O resultado positivo por afinidade ficou evidente (pontos mais escuros e de maior tamanho de halo) nas amostras dos sobrenadantes dos ensaios nos biorreatores (**Figura 30**).

Figura 30 - Teste de reação com anticorpo policlonal Anti-LOPAP (“Dot Blot”)

Legenda: 1, 2, 3 e 4 = alíquotas de sobrenadante de cultivo em agitador rotativo, no tempo de 84 h, com metanol como fonte de carbono; 5, 6, 7 e 8 = alíquotas de sobrenadante de cultivo em agitador rotativo, no tempo de 84 h, com metanol como fonte de carbono e com adição de tunicamicina; 9 = sobrenadante do final do ensaio 2 em biorreator, com tunicamicina; 10 = sobrenadante do final do ensaio 3 em biorreator; 11 = sobrenadante do final do ensaio 1 em biorreator; 12, 13, 14, e 15 = alíquotas de sobrenadante de cultivo em agitador rotativo, no tempo de 98 h, com metanol como fonte de carbono; 16 = biomassa do ensaio 2; 17 = biomassa do ensaio 1; 18 = solução salina (controle reação de fundo); 19 = albumina bovina (controle negativo). **Retângulo amarelo** destacando o resultado das amostras dos sobrenadantes coletados dos ensaios de biorreator. **Círculo verde** destacando ausência de reação dos anticorpos com outra proteína (albumina).

A purificação foi feita em duas etapas de cromatografia, especificamente uma troca iônica (QFF) e uma exclusão por tamanho em gel filtração (GF), de uma fração estocada de cada um dos sobrenadantes separados dos ensaios de produção 1, 2 e 3. Nestas purificações, foi purificado em paralelo uma amostra de referência, o rLOPAP Butantan, que é um sobrenadante de ensaio de produção de LOPAP com a

mesma cepa utilizada neste trabalho, mas produzido em 2006, no IPT e caracterizado no I. Butantan. Como este rLOPAP Butantan apresenta atividade enzimática, ele foi utilizado para monitorar quais das frações eluentes da cromatografia continham o rLOPAP produzido nos ensaios 1 à 3, que não apresentaram atividade enzimática. As figuras 31 e 32 ilustram um perfil cromatográfico de exemplo, obtidos em cada etapa cromatográfica realizada.

Finalizadas as purificações por cromatografia e as concentrações das alíquotas por centrifugação e filtração, as quantidades proteicas nos materiais recuperados foram dosadas e estão listados na **TABELA 3**. Os materiais foram divididos para análises posteriores: SDS-PAGE, teste de citoproteção e dicroísmo circular.

Figura 31 - Perfil cromatográfico da etapa de troca iônica.

Sobreposição dos cromatogramas de uma injeção de cada material, monitorados no comprimento de onda (λ) de 280 nm. A seta indica a fração onde separou o rLOPAP. Identificação: “rLOPAP Butantan” (azul claro), “Ensaio 1” (cinza), “Ensaio 2” (verde) e “Ensaio 3” (azul escuro).

Figura 32 - Perfil cromatográfico da etapa de gel filtração.

Sobreposição dos cromatogramas de uma injeção de cada fração dos materiais (fração que contém o rLOPAP separada na cromatografia de troca iônica) monitoradas no comprimento de onda (λ) de 280 nm. A seta indica a fração onde separou o rLOPAP. Identificação: “rLOPAP Butantan” (verde claro), “Ensaio 1” (laranja), “Ensaio 2” (marrom) e “Ensaio 3” (azul claro).

Tabela 03 - Materiais purificados, recuperação e concentração proteica.

Material	Volume Inicial (mL)	Volume Final (mL)	Concentração Proteica (mg/L)
rLOPAP Butantan	500	0,75	0,209
Ensaio 1	500	6,10	0,316
Ensaio 2	500	1,35	0,286
Ensaio 3	500	3,30	0,714

rLOPAP Butantan = sobrenadante que contém rLOPAP, fornecido pelo I. Butantan, utilizado como amostra de referência.

As alíquotas de cada etapa de purificação foram analisadas em um gel de SDS-PAGE para acompanhar o clareamento do material. O resultado está apresentado na **Figura 33** abaixo.

Figura 33 - SDS-PAGE de frações coletadas durante as etapas de purificação

P= padrão de massa molecular (kDa de cima para baixo = 97; 66; 45; 30; 20,1 e 15)

1= sobrenadante rLOPAP Butantan após diafiltração;

2= rLOPAP Butantan concentrado após cromatografia de troca iônica;

3= rLOPAP Butantan concentrado após cromatografia de gel filtração;

4= sobrenadante do ensaio 2 (com tunicamicina) após diafiltração;

5= ensaio 2 (com tunicamicina) após cromatografia de troca iônica;

6= ensaio 2 (com tunicamicina) concentrado após cromatografia de gel filtração;

7= sobrenadante do ensaio 1 após diafiltração;

8= ensaio 1 após cromatografia de troca iônica;

9= ensaio 1 concentrado após cromatografia de gel filtração;

10= sobrenadante do ensaio 3 após diafiltração;

11= ensaio 3 após cromatografia de troca iônica;

12= ensaio 3 concentrado após cromatografia de gel filtração;

O ensaio da citoproteção celular, propriedade que também caracteriza o rLOPAP, foi realizado para cada material purificado como descrito em **4.2.9** e seus resultados estão na **Figura 34** abaixo.

Figura 34 - Teste de citoproteção em células HUVEC, em cultivo.

Células HUVEC incubadas em cultivo com SFB a 1% (condição proapoptótica) em presença de diferentes concentrações dos r-LOPAP (µg/mL) purificados dos ensaios de biorreatores e da amostra referência r-LOPAP Butantan. O gráfico do Ensaio 2, com tunicamicina, deu o melhor desempenho, com recuperação de 97,5% da viabilidade celular na concentração de rLOPAP de 1,1 µg/mL .

A análise de dicroísmo circular dos rLOPAP produzidos em cada ensaio de biorreator, foi executada como descrita em **4.2.10** e o resultado obtido graficamente (**Figura 35**). O gráfico correlaciona para, cada comprimento de onda, o valor de energia absorvida e calculada em unidade específica. A variação gráfica depende da quantidade de folhas β e α hélices presentes em cada estrutura. Espera-se para leituras de proteínas iguais em seu *folding* correto, perfis de dicroísmo muito próximos. Diferenças de concentração da proteína no material analisado são corrigidas pelo algoritmo de cálculo. Foi observado durante as medições que a leitura de energia de fundo estava muito alta e as medições ficaram pouco precisas para cálculos percentuais de estruturas secundárias.

Figura 35 - Perfis de dicroísmo circular obtidos dos materiais purificados.

A - rLOPAP Butantan; **B** - ensaio 2 com tunicamicina; **C** - ensaio 1; **D** - ensaio 3. Para todos os gráficos: linha azul com quadrados indica o valor corrigido pelo cálculo do algoritmo K2D; linha verde com pontos indica o valor das medições do equipamento; linhas vermelhas verticais e paralelas indicam a diferença entre o valor lido e o valor calculado.

6 DISCUSSÃO

Os três lotes produzidos de LOPAP recombinante em biorreator, seguindo as condições utilizadas no trabalho de Carrijo-Carvalho (2009) e também descritas no protocolo Invitrogen (*Pichia Fermentation Process Guidelines, version B 053002*), resultaram em uma alta densidade celular, atingindo 137 g/L de biomassa seca, sem aparente perda por morte celular durante a troca de fonte de carbono, conforme visualizado nos gráficos (**Figuras 20 à 22**), podendo-se sugerir que o método de cultivo celular desenvolvido foi robusto. É importante ressaltar que não foi possível manter a temperatura, durante a alimentação com metanol, em 26 °C, como indicado nas referências utilizadas, por problema no módulo de arrefecimento do equipamento. A temperatura interna do biorreator oscilou, influenciada pelas condições ambientais e pelo metabolismo das células quando alimentadas com metanol. As **Figuras 23, 24 e 25** exibem a variação da temperatura ao longo dos ensaios.

Dados de literatura apontam que a temperatura influencia diretamente na quantidade e na atividade da proteína recombinante expressa pela *P. pastoris*. Whittaker; Whittaker (2000) aumentaram a produção de galactose oxidase em *P. pastoris* em quatro vezes, diminuindo a temperatura durante a alimentação com metanol de 30 °C para 25 °C. Hong et al. (2002), expressaram lacase, uma enzima oxidante de fenol presente em plantas e fungos, em *Pichia* em duas temperaturas diferentes, 30 °C e 20 °C, e testaram as atividades das enzimas recombinantes obtidas, encontrando 3,3 U/mL e 11,5 U/mL, respectivamente. Outros trabalhos são citados por Gao e Shi (2013), mencionando que temperaturas mais baixas proporcionam um melhor enovelamento da proteína recombinante e diminuem a secreção de proteases pela levedura, embora diminuam a velocidade de crescimento.

Nos dados de monitoramento da temperatura durante os ensaios realizados, é facilmente visualizado a fase de crescimento em glicerol, estável na temperatura de 30 °C, em todos os três ensaios. Em seguida, na fase de indução de expressão com metanol, nos ensaios 1 e 2, houve um período, próximo de 70 h de cultivo, com o módulo de arrefecimento funcionando corretamente, mantendo-se a temperatura em 26 °C. Neste tempo de cultivo o módulo parou de funcionar e as temperaturas oscilaram em torno de 27 °C no ensaio 2 e 28 °C no ensaio 1. Curiosamente, os dois

ensaios foram executados em paralelo, um em cada biorreator, nas mesmas datas, com as mesmas condições ambientais e partindo de um mesmo inóculo. Entretanto, visualmente a diferença média de temperatura entre eles é de mais de 1 °C. Podemos inferir que esta diferença, deve-se, provavelmente, à diferença de metabolismo nas células de cada cultivo, devido a tunicamicina que foi adicionada ao ensaio 2, em concentração inibitória de N-glicosilações (3,19 µg/mL, considerando o volume final do biorreator). Assim, várias enzimas de expressão constitutiva da *Pichia*, deixaram de ser glicosiladas, interferindo no metabolismo normal das células, e na produção de calor.

No ensaio 3, porém, apesar de ter sido realizado desde o começo sem o módulo de arrefecimento, a temperatura média manteve-se dentro do esperado (26 °C), atingindo picos inferiores, pelas condições climáticas ambientais. Entretanto o LOPAP produzido neste ensaio não apresentou atividade enzimática.

A utilização da diafiltração acelerou a clarificação inicial da amostra, concentrou-a e a condicionou no tampão da primeira purificação cromatográfica, servindo também para concentrar as frações entre as purificações cromatográficas, trabalhando com volumes maiores em menor tempo. As duas etapas de purificação cromatográficas que se seguiram foram eficientes para obter o material isolado ao final, visível nos cromatogramas e no SDS-PAGE.

Os testes de caracterização do LOPAP recombinante produzido mostraram que a proteína foi expressa. O sobrenadante dos três lotes produzidos deram resultado positivo no DotBlot, mesmo estando em estado bruto diluído. No SDS-PAGE foi visualizada a banda do LOPAP no tamanho esperado de aproximadamente 21 kDa. A mesma banda aparece no rLOPAP Butantan, produzido em 2006 e estocado no Instituto Butantan, que foi purificado novamente junto com amostras dos lotes produzidos neste trabalho, para servir como referência.

Uma avaliação preliminar de ausência de N-glicosilações, recorrente em proteínas heterólogas, expressas em leveduras, é observado também no SDS-PAGE, nas figuras 18 e 33. A banda do LOPAP produzido no ensaio com inibidor de N-glicosilação, ensaio 2, tem o tamanho de 21 kDa, assim como nos demais lotes. Esse resultado inicial indica que o único sítio passível de N-glicosilação na proteína recombinante, o resíduo ASP154, não tem carboidratos adicionados. Mais testes são necessários para comprovação deste resultado.

Os testes de atividade enzimática demonstraram que o LOPAP recombinante produzido nos três lotes de biorreator não apresenta atividade ativadora de protrombina. Os testes foram realizados junto com o rLOPAP Butantan que serviu como controle positivo. A elucidação definitiva da estrutura terciária e consequentemente de seu sítio catalítico ainda é objeto de estudo, entretanto, Reis et al. (2006) propuseram um modelo de estrutura terciária robusto, baseado em testes com a proteína nativa, com LOPAP recombinante expressa em *E. coli* e em bioinformática. Neste modelo proposto o sítio catalítico é composto por três resíduos de aminoácidos: Ser119, Glu 167 e His 168, localizados respectivamente, o primeiro na folha- β 8 do barril- β e os outros dois na α -hélice 1 adjacente ao barril- β . Isto implica que a atividade enzimática depende diretamente de correta estrutura terciária na proteína.

Os perfis obtidos no ensaio de dicroísmo circular (CD) compararam a preponderância das estruturas secundárias nas proteínas recombinantes de cada lote. O perfil de CD da proteína ativa, rLOPAP Butantan, é muito diferente do perfil das demais. Este resultado sugere uma conformação terciária diferente, consequentemente a posição dos aminoácidos que compõem o possível sítio catalítico não foi mantida, resultando em perda de atividade. Essa conclusão é fortalecida levando-se em conta a variação da temperatura durante a expressão e literaturas a respeito.

Embora o LOPAP recombinante tenha sido expresso sem atividade enzimática, sua atividade citoprotetora ficou preservada. Estudos apontam que esta propriedade está relacionada com a presença de segmentos de peptídeos altamente preservados na família das lipocalinas (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010). O ensaio de citoproteção demonstrou que os três lotes de LOPAP produzidos tem ação citoprotetora, com resultado mais pronunciado para a proteína do ensaio E1F1.

7 CONCLUSÃO

LOPAP recombinante foi produzido em linhagem de levedura *Pichia pastoris*, segundo protocolos de produção já estabelecidos, purificado e avaliado quanto a sua massa molecular, atividade enzimática, atividade citoprotetora, estrutura secundária e possível presença de N-glicosilações.

A proteína obtida não apresentou atividade enzimática, provavelmente por uma má formação terciária durante a fase de expressão no processo de produção.

O LOPAP obtido em cultivo com tunicamicina demonstrou o mesmo perfil de massa molecular, comparativamente aos outros produzidos sem inibidor, indicando possivelmente que seu único sítio para N-glicosilação (N₁₅₄) não estava glicosilado. Outros testes mais seletivos serão necessários para confirmar este resultado.

A influência de parâmetros do processo de produção na conformação terciária do LOPAP recombinante necessita de mais estudos. A temperatura não parece ter sido o fator determinante do aspecto de conformação das proteínas neste trabalho. Um número maior de ensaios é necessário para se estabelecer uma conclusão sobre um processo efetivo, proteína com massa molecular esperada e atividades mantidas.

REFERÊNCIAS²

- AKERSTROM, B.; FLOWER, D. R.; SALIER, J. P. Lipocalins: unity in diversity. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1482, p. 1-8, 2000.
- ANDERSEN, J. F. et al. Nitric oxide binding and crystallization of nitrophorin I, a nitric oxide transport protein from the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Biochemistry**, v. 36, p. 4423-4428, 1997.
- ANDERSEN, J. F. et al. The crystal structure of nitrophorin 4 at 1.5 Å resolution: transport of nitric oxide by a lipocalin-based heme protein. **Structure**, v. 6, p. 1315-1327, 1998.
- ANDERSEN, J. F. et al. The role of salivary lipocalins in blood feeding by *Rhodnius prolixus*. **Arch. Insect Biochem. Physiology**, v. 58, p. 97-105, 2005.
- ANDRADE, S. A. et al. Reversal of the anticoagulant and anti-hemostatic effect of low molecular weight heparin by direct prothrombin activation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 45, n. 10, p. 929-934, 2012.
- ARJMAND, S. et al. Expression and purification of functionally active recombinant human alpha 1-antitrypsin in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Avicenna J Med Biotech**, v. 3, n. 3, p. 127-134, 2011.
- AROCHA-PIÑANGO, C. L.; GUERRERO, B. *Lonomia* Genus Caterpillar Envenomation: Clinical and Biological Aspects. **Haemostasis**, v. 31, p. 288-293, 2001.
- AROCHA-PIÑANGO, C. L.; MARVAL, E.; GUERRERO, B. *Lonomia* genus caterpillar toxins: Biochemical aspects. **Biochimie**, v. 82, p. 937-942, 2000.
- AZAD, M. A. K. et al. Structure-activity relationships for the binding of polymyxins with human α -1-acid glycoprotein. **Biochem Pharm**, v. 84, i. 31, p. 278-291, 2012. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.05.004>)
- BERGER, M. et al. Mechanisms of acute kidney injury induced by experimental *Lonomia obliqua* envenomation. **Arch Toxicol**, May 2014. doi:10.1007/s00204-014-1264-0. Acesso em Jul. 2014.
- BLANER, W. S. Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. **Endocr Rev**, v.10, p. 308-316, 1989.
- BRADFORD, M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities

² De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Série A, Normas e Manuais Técnicos. 7. ed. Brasília, DF, 2010. Caderno 14. Acidentes por Animais Peçonhentos.

BROWN JR, K. S.; FREITAS, A. V. L. Lepidoptera. In: BRANDÃO, C. R. F.; CANCELLO, E. M. (Ed.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil - Invertebrados Terrestres**. São Paulo: FAPESP, 1999. 279 p.

CAOVILLA, J. J. **Avaliação da eficácia do soro antilonômico na reversão da síndrome hemorrágica causada por contato com lagartas da *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae)**. 2003, 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Pós-Graduação Interinstitucional em Medicina, Universidade de Passo Fundo, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Passo Fundo, 2003.

CARDOSO, A. E. C.; HADDAD, C. Acidentes por Lepidópteros (larvas e adultos de mariposas): estudo dos aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. **An Bras Dermatol**, v.80, n.6, p. 571-578, 2005.

CARRIJO-CARVALHO, L. C. **LOPAP (*Lonomia obliqua* prothrombin activator protease): clonagem e expressão em levedura *Pichia pastoris*, obtenção de um peptídeo sintético, análise estrutural e avaliação de suas potenciais aplicações**. 2009. 196 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP – I.Butantan – IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

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

CHAN, K. et al. Caterpillar-induced bleeding syndrome in a returning traveler. **CMAJ**, v. 179, n. 2, p. 158-161, 2008.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. et al. A lipocalin sequence signature modulates cell survival. **FEBS Letters**, v.584, p. 2896-3000, 2010.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. et al. Exogenous procoagulant factors as therapeutic and biotechnological tools. **J Blood Disorders Transf**, v. 5, p. 209, 2014. doi: 10.4172/2155-9864.1000209.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. et al. Toxins from *Lonomia obliqua* - Recombinant production and molecular approach. In: RADIS-BAPTISTA, G (Ed.) **An Integrated**

View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications. Intech, 01 July, 2013. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/an-integrated-view-of-the-molecular-recognition-and-toxinology-from-analytical-procedures-to-biomedical-applications/toxins-from-lonomia-obliqua-recombinant-production-and-molecular-approach>>. Acesso em: 29 Jan. 2014.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; ALVAREZ-FLORES, M. P. Exploring new molecules and activities from *Lonomia obliqua* caterpillars. **Pathophysiol Haemost Thromb**, v. 34, n. 4-5, p. 228-233, 2005

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; ALVAREZ-FLORES, M. P. South American *Lonomia obliqua* Caterpillars: Morphological Aspects and Venon Biochemistry. In: GUERRITORE, E.; DESARE, J. (Ed.) **Lepidoptera**. 1st ed. [S.I.]: Nova Science Publishers Inc., 2013. cap.6, p. 169-185.

CÓRDOBA, A. M. et al. Accidente lonómico: estado del arte. **Acta Colombiana de Cuid Intens**, v. 11, n. 3, p. 254-260, 2011.

CROW, J. M.; NELSON, J. D.; REMINGTON, S. G. Human lipocalin-1 association with 3H-testosterone and 3H-estradiol. **Curr Eye Res**, v. 34, n. 12, p. 1042-1049, 2009.

DAHLBÄCK, B.; NIELSEN, L. B. Apolipoprotein M affecting lipid metabolism or just catching a ride with lipoproteins in the circulation? **Cellular and molecular life sciences**, v. 66, n. 4, p. 559-564, 2009.

DAHLBÄCK, B.; NIELSEN, L. B. Apolipoprotein M-a novel player in high-density lipoprotein metabolism and atherosclerosis. **Current opinion in lipidology**, v. 17, n. 3, p. 291-295, 2006.

DIAS DA SILVA, W. et al. Development of an antivenom against toxins of *Lonomia obliqua* caterpillars. **Toxicon**, v. 34, i. 9, p. 1045-1049, 1996.

DONATO, J. L. et al. *Lonomia obliqua* caterpillar trigger human blood coagulation via activation of factor X and prothrombin. **Thromb Haemost**, v.79, p. 539-542, 1998.

DRAKEMAN, D. L. Benchmarking biotech and pharmaceutical product development. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 621-625, 2014.

DUARTE, C. A. et al. Insuficiência renal aguda por acidentes com lagartas. **J Bras Nefrol**, v. 12, p. 184-187, 1990.

ECKART, M. R.; BUSSINEAU, C. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 525-530, 1996.

FLOWER, D. R. The lipocalin protein family: structure and function. **Biochem J**, v.

318, pt. 1, p. 1-14, 1996.

FLOWER, D. R.; NORTH, A. C. T.; SANSOM, C. E. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. **Bioch et Biophysica Acta**, v. 1482, p. 9-24, 2000.

FRITZEN, M. et al. A prothrombin activator (Lopap) modulating inflammation, coagulation and cell survival mechanisms. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 333, p. 517-523, 2005.

FUKUHARA, A. et al. Drug delivery system for poorly water-soluble compounds using lipocalina-type prostaglandin D synthase. **J Control Release**, v. 159, p. 143-150, 2012.

GAMBORGI, G. P. et al. Influência dos fatores abióticos sobre casos de acidentes provocados por *Lonomia obliqua*. **Rev Bras Geo Med Saude**, v. 8, n. 14, p. 201-214, jun 2012.

GAO, M.; SHI, Z. Process control and optimization for heterologous protein production by methylotrophic *Pichia pastoris*. **Chinese J of Chem Eng**, v. 21, n. 2, p. 216-226, 2013.

GARCIA, C. M. **Estudo Dos Acidentes Com A Lagarta *Lonomia Obliqua* Walker, 1855 No Paraná – Período 1989-2001. 2006.** 115 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Curso de Pós-Graduação em Geografia, Setor de Ciências da Terra - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

GARCIA, C. M.; DANNI-OLIVEIRA, I. M. Ocorrência de acidentes provocados por *Lonomia obliqua* Walker, no Estado do Paraná, no período de 1989 a 2001. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 2, p. 242-246, mar-abr, 2007.

GUERRERO, B. et al. The effects of Lonomin V, a toxin from the caterpillar (*Lonomia Achelous*), on hemostasis parameters as measured by platelet function. **Toxicon**, v. 41-40, p. 1-11, 2011.

GULLAN, P. J, CRANSTON P. **The insects: an outline of entomology.** 3rd ed. Malden, MA. USA: Wiley-Blackwell, 2004.

HEINE, T. E. et al. Effects of *Lonomia obliqua* caterpillar venom upon de proliferation and viability of cell lines. **Cytotechnology**, v. 66, n. 1, p. 63-74, 2014. doi: 10.1007/s10616-013-9537-7

HEPPNER, J. B. Faunal regions and the diversity of Lepidoptera. **Tropical Lepidoptera**, Gainesville, n. 2, p. 1-85, 1991. Suppl.

HOHLBAUM, A. M.; SKERRA, A. Anticalins®: the lipocalin family as a novel protein scaffold for the development of next-generation immunotherapies. **Expert Review of**

Clinical Immunology, v. 3, n. 4, p. 491-501, 2007.

HOLDEN, H. M. et al. The molecular structure of insectcyanin from de tobacco hornworm *Manduca sexta* L. at 2.6Å resolution. **The EMBO J**, v.6, f. 6, p.1565-1570, 1987.

HONG, F.; MEINANDER, N. Q.; JÖNSSON, L. J. Fermentation strategies for improved heterologous expression of Laccase in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 438-449, 2002.

HOSSLER, E. W. Caterpillars and moths Part I. Dermatologic manifestations of encounters with *Lepidoptera*. **J Am Acad Dermatol**, v. 62, n. 1, p. 1-10, 2010a.

HOSSLER, E. W. Caterpillars and moths Part II. Dermatologic manifestations of encounters with *Lepidoptera*. **J Am Acad Dermatol**, v. 62, n. 1, p. 13-28, 2010b.

HOSSLER, E. W. Caterpillars and moths. **Dermatol Ther**, v. 22, n. 4, p. 353-366, 2009.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, p. 23-28, 1990.

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

KELEN, E. M. A.; DUARTE, A. C.; TOMY, S. C. et al. Acquired hemorrhagic syndrome from contact with a caterpillar (*Lonomia obliqua* Walker 1855, *Saturniidae*). **Toxicon**, v. 34, n. 2, p. 146, 1996.

KELEN, E. M. A.; PICARELLI, Z. P.; DUARTE, A. C. Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillars of the genus *Lonomia* (*Saturniidae*, *Hemileucinae*). **J Toxicol Toxin Rev**, v. 14, p. 283-308, 1995.

KOWACS, A. et al. Fatal Intracerebral Hemorrhage Secondary to *Lonomia obliqua* Caterpillar Envenoming. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 64, n.4, p.1030-1032, 2006.

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

LAWRENCE, S.; LAHTENMAKI, R. Public biotech 2013 - the numbers. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 626-632, 2014.

LEMAIRE, C. Révision du genre *Lonomia* Walker [Lep. Attacidae]. **Annales Soc.Ent. Fr.**, (N. S.), v. 8, n. 4, p. 767-861, 1972.

LORINI, L. M.; CORSEUL, E. Aspectos Morfológicos de *Lonomia obliqua* Walker

(*Lepidoptera: Saturniidae*). **Neotrop Entomol**, v. 30, p. 373-378, 2001.

LUCENA, S.; SALAZAR, A. M.; GIL, A.; AROCHA-PIÑANGO; B. S.; The action of Lonomin V (*Lonomia achelous*) on fibronectin functional properties. **Thrombosis Research**, v. 121, p. 653-661, 2008.

MACAULEY-PATRICK, S. et al. Heterologous protein production using the *Pichi pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p. 249-270, 2005.

MEEHL, M. A.; STADHEIM, T. A. Biopharmaceutical discovery and production in yeast. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 30, p. 120-127, 2014.

MERCADANTE, A. C. T. **Produção de anticorpos monoclonais contra componentes do veneno de *Lonomia obliqua* e caracterização parcial da lipocalina isolada**. 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense - Darcy Ribeiro. Campos de Goytacazes, 2008.

MESQUITA PASQUALOTO, K. F.; CARRIJO-CARVALHO, L. C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Rational development of novel leads from animal secretion based on coagulation and cell targets: In silico analysis to explore a peptide derivative as lipocalins' signature. **Toxicon**, v. 69, p. 200-210, 2013.

MEYNIAL-SALLES, I.; COMBES, D. In vitro glycosylation of proteins: an enzymatic approach. **J Biotechnol**, v. 46, p. 1-14, 1996.

MONTFORT, W. R.; WEICHSEL, J.; ANDERSEN, J. F. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalinas from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. **Biochim Biophys Acta**, v. 1482, p. 110-118, 2000.

MOREIRA, D. C. **Caracterização bioquímica e biológica de fosfolipases presentes em veneno de *Loxosceles intermedia* e *Lonomia obliqua***. 2011. 349 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrilamide gels a modified procedure with enhanced uniform sensivity. **Anal. Biochem**, v. 117, p. 311-314, 1982.

MÜLLER, H. N.; SKERRA, A. **Biochemistry**, v. 33, p. 14126-14135, 1994.

NEWCOMER, M. E. et al. The three-dimensional structure of retinol-binding protein. **Embo J.**, v. 3, p. 1451-1454, 1984.

NOESKE-JUNGBLUT, C. et al. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. **J Biol Chem**, v. 270, p. 28629-28634, 1995.

OLIVEIRA, G. L. O. Estratégias para descoberta e desenvolvimento de moléculas com potencial ação no sistema hemostático. **CR-Bio-01**, v. 2, p. 24-29, 2011.

PERVAIZ, S.; BREW, K. Homology of beta-lactoglobulin, serum retinol-binding protein, and protein HC, **Science**, v. 228, p. 335-337, 1985.

PERVAIZ, S.; BREW, K. Homology of beta-lactoglobulin, serum retinol-binding protein, and protein HC. **Science**, v. 228, p. 335-337, 1985.

REIS, C. V. A Ca^{++} activated serine protease (LOPAP) could be responsible for the haemorrhagic syndrome caused by the caterpillar *Lonomia obliqua*. **The Lancet**, v. 353, p. 1942, 1999.

REIS, C. V. **Clonagem, sequenciamento, expressão e caracterização parcial da estrutura do Lopap, um ativador de protrombina da lagarta *Lonomia obliqua***. 2002. 123 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2002.

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

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, p. 437-443, 2001a.

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, p. 295-302, 2006.

RICCI-SILVA, M. E. et al. Immunochemical and proteomic technologies as tools for unravelling toxins involved in envenoming by accidental contact with *Lonomia obliqua* caterpillars. **Toxicon**, v. 51, f. 6, p. 1017-1028, 2008.

RICHTER, A.; EGGENSTEIN, E.; SKERRA, A. Anticalins: Exploiting a non-Ig scaffold with hypervariable loops for the engineering of binding proteins. **Febbs Letters**, v. 588, p. 213-218, 2014.

RILEY, M. L. et al. High-level expression and characterization of a glycosylated covalently linked dimer of the prion protein. **Protein Engineering**, v.15, n. 6, p. 529-537, 2002

SANCHEZ, D. et al. Exon-Intron structure and evolution of the Lipocalin gene family. **Mol Biol Evol**, v. 20, n. 5, p. 775-783, 2003.

SCHLEHUBER, S. et al. A novel type of receptor protein, based on the lipocalina scaffold, with specificity for digoxigenin. **J Mol Biol**, v. 297, p. 1150-1120, 2000.

SCHLEHUBER, S.; SKERRA, A. Lipocalins in drug discovery: from natural ligand-binding proteins to anticalins. **Drug Discov Today**, v. 10, n. 1, p. 23-33, jan. 2005.

SKERRA, A. Alternative binding proteins: Anticalins – harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. **FEBS J**, v. 275, p. 2677-2683, 2008.

SKERRA, A. Lipocalins as a scaffold. **Biochim Biophys Acta**, v.1482, p. 337-350, 2000.

VEIGA, A. B. G. 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. et al. Examination of the ligand-binding and enzymatic properties of a bilin-binding protein from the poisonous caterpillar *Lonomia obliqua*. **Plos One**, v. 9, n. 6, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0095424.

VEIGA, A. B.; BLOCHTEIN, B.; GUIMARÃES, J. A. Structures involved in production, secretion and injection of the venom produced by the caterpillar *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae). **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1343-1351, 2001.

VULINEC, K. Collective security: aggregation by insects as a defense. In: EVANS, D. L.; SCHMIDT, J. O. (Ed.). **Insect defenses - adaptive mechanisms and strategies of prey and predators**. New York: State University of New York, 1990. p. 251-288.

WAISMAM, K. et al. Lopap: A non-inflammatory and cytoprotective molecule in neutrophils and endotelial cells. **Toxicon**, v. 53, p. 652-659, 2009.

WANG, C. et al. Influence of carbohydrate moiety on the stability of glycoproteins. **Biochemistry**, v. 35, p. 7299-7307, 1996.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Dichroweb, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic Acids Res**, v. 32, p. 668-673, 2004.

WHITTAKER, M. M.; WHITTAKER, J. W. Expression of recombinant galactose oxidase by *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, n. 20, p. 105-111, 2000.

WITHMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses for circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n.5, p. 392-400, 2007.

WLIAN, L. et al. Wound healing effects of a Lipocalin-derived peptide. **J Clin Toxicol**, v. 4:2, 2014. doi: 10.4172/2161-0495.187.

WURCH, T.; PIERRE', A.; DEPIL, S. Novel protein scaffolds as emerging therapeutic proteins: from discovery to clinical proof-of-concept. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 575-582, 2012.

WYSZYŃSKI, F. J. **Dissecting tunicamycin biosynthesis: A potent carbohydrate processing enzyme inhibitor**. 2010. 317 p. Thesis (Ph.D) - Trinity Term - Oxford University, London, UK, 2010.

ZANNIN, M. et al. Blood coagulation and fibrinolytic factors in 105 patients with hemorrhagic syndrome caused by accidental contact with *Lonomia obliqua* caterpillar in Santa Catarina, Southern Brazil. **J Thromb Haemost**, v. 89, p. 355-364, 2003.