

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Análises Clínicas

Subclonagem, expressão e purificação da enzima Hialuronidase-1,  
variante 8, humana.

Versão original encontra-se disponível no serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Adriana Del Monaco De Maria

Dissertação para obtenção do grau de:

**MESTRE**

Orientador:

Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata.

São Paulo

2013

Adriana Del Monaco De Maria

Subclonagem, expressão e purificação da enzima Hialuronidase-1,  
variante 8, humana.

Comissão Julgadora da Dissertação  
para obtenção do grau de Mestre

Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata  
Orientador/presidente

---

1º Examinador

---

2º Examinador

---

3º Examinador

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2013.

**Ficha Catalográfica**  
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Del Monaco de Maria, Adriana  
D359s Subclonagem, expressão e purificação da enzima hialuronidase-1,  
variante 8, humana / Adriana Del Monaco de Maria. -- São  
Paulo, 2013.  
79p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas  
e Toxicológicas.  
Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

1. Biologia molecular 2. Clonagem gênica : Genética experimental  
I. T. II. Hirata, Mario Hiroyuki, orientador.

574.88 CDD

## **DEDICATÓRIA**

## **DEDICATÓRIA:**

Os meus queridos pais, familiares amigos e colegas sabem a imensa importância que tiveram em toda a minha trajetória até aqui, me dando carinho, coragem e força para enfrentar todos os desafios e exemplos indiscutíveis de caráter.

## **AGRADECIMENTOS**

## **AGRADECIMENTOS**

Meus sinceros agradecimentos,

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario H. Hirata, pela motivação no trabalho, pelo respeito por todos os seus alunos, pela postura correta e caráter idôneo, pelo carinho e dedicação com que incentiva a todos ao amor pela pesquisa científica e, principalmente, por uma grande lição que foi me ensinar a continuar acreditando na humanidade, mesmo diante das situações desanimadoras que temos vivido nos últimos tempos. Minha admiração, respeito e eterna gratidão.

Aos meus queridos colegas, do laboratório e da faculdade, que tornaram o meu dia a dia muito mais agradável e alegre além de ser uma excelente companhia dentro desta rotina estressante que vivemos. Muito obrigada pelo apoio, pelo carinho e pela paciência de todos: Gisele Medeiros, Juliana Germano, Juliana Santos, Aécio Braga, Joás Silva, Gabriela Guimarães, Vívian Bonezi, Marcelo Miyata, Tamires, Dalila Cunha, Rafael Moura, Raphael Boni, Thainara Miyashiro, Thaianne Malafatti, Livia Ferrari, Giovanna Liguori, Edgard Tagushi, Gabriel Moreli, Fernando Lima, Guilherme Leite, Adriano Yamaji, Kamila Sayuri.

Aos meus professores, pelo auxílio em momentos muito importantes do nosso trabalho, pelas idéias, pela atenção, pelo carinho, pelas conversas, pela

paciência e pelo exemplo na minha formação. Profa. Rosário D C Hirata, Profa. Irene Soares, Prof. Rodrigo Cunha, Profa. Christiane Lombello, Profa. Juliana Daguano, Profa. Sônia Malmonge e Prof. Aron Andrade. À Química Cristina, pelo apoio, pelo trabalho, pelo carinho e pela paciência com que cuida de tudo e de todos no laboratório, à Farmacêutica Kátia e às secretárias Ana, Suely e Edna pela ajuda e pela paciência.

Aos meus pais, Isabel e Magno por tudo o que fizeram por mim até hoje e pelo amor incondicional, ao meu irmão Rodrigo, pelo exemplo de força, dedicação e foco e pelo carinho, companhia e amor, nos últimos 21 anos de nossa existência, ao meu namorado Gabriel e às minhas irmãs de coração Carolina e Lais, pelo apoio, força, carinho, amizade e paciência, e a toda a minha família pelo apoio em todos os momentos.



*“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

(Albert Einstein, 1879-1955)

*“Se, a princípio, a ideia não é absurda,  
então não há esperança para ela.”*

(Albert Einstein, 1879-1955)

## SUMÁRIO

## **SUMÁRIO**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>LISTAS</b>   | <b>12</b> |
| <b>LISTA DE TABELAS</b>   | <b>13</b> |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>   | <b>14</b> |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>  | <b>18</b> |
| <b>RESUMO</b>   | <b>22</b> |
| <b>ABSTRACT</b>   | <b>24</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>  | <b>26</b> |
| 1.1 A matriz extra-celular e o ácido hialurônico.                           | 26        |
| 1.2 A família das Hialuronidas e suas características.                      | 27        |
| 1.3 As Hialuronidas e algumas aplicações.                                   | 31        |
| 1.4 A tecnologia do DNA recombinante.                                       | 35        |
| <b>2. OBJETIVOS</b>   | <b>39</b> |
| 2.1 Objetivo Geral:   | 39        |
| 2.2 Objetivos Específicos:  | 39        |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>  |           |
| 3.1 Síntese dos oligonucleotídeos e obtenção do inserto:                    | 41        |
| 3.2 Transformação bacteriana, expansão do plasmídeo e restrição enzimática: | 42        |
| 3.3 Subclonagem no vetor de expressão:                                      | 43        |
| 3.4 Identificação dos clones com a sequência da Hyal-1:                     | 45        |
| 3.5 Sequenciamento de DNA:  | 46        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.6 Determinação das melhores condições para expressão da Hyal-1:</b>                           | <b>46</b> |
| <b>3.7 Confirmação da expressão:</b>   | <b>48</b> |
| <b>3.8 Purificação da proteína:</b>  | <b>49</b> |
| <br>   |           |
| <b>4. RESULTADOS</b>   |           |
| <b>4.1 Síntese dos oligonucleotídeos e obtenção do inserto:</b>                                    | <b>52</b> |
| <b>4.2 Transformação bacteriana, expansão do plasmídeo e restrição enzimática:</b>                 | <b>52</b> |
| <b>4.3 Subclonagem no vetor de expressão e identificação dos clones com a sequência da Hyal-1:</b> | <b>53</b> |
| <b>4.4 Determinação das melhores condições para expressão da Hyal-1:</b>                           | <b>55</b> |
| <b>4.5 Confirmação da expressão:</b>   | <b>56</b> |
| <b>4.6 Purificação da proteína:</b>  | <b>57</b> |
| <br>   |           |
| <b>5. DISCUSSÃO</b>  | <b>60</b> |
| <br>   |           |
| <b>6. CONCLUSÃO</b>  | <b>67</b> |
| <br>   |           |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | <b>69</b> |

**LISTAS**

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fitas senso e anti-senso dos oligonucleotídeos sintetizados e suas respectivas sequências iniciadoras e temperaturas de desnaturação.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura tridimensional proposta para Hyal-1, extraída do banco de dados de estruturas de proteínas PDB (<http://www.rcsb.org/pdb>).

Figura 2 – Hidrólise do Ácido Hialurônico catalisada pela enzima Hialuronidase (modificado do banco de dados UniProtKB®).

Figura 3: Esquema representativo da clivagem dos polímeros de alta massa molecular HA na superfície celular pela Hialuronidase em fragmentos de menor peso molecular. Reorganização das fibras de actina com o consequente aumento da permeabilidade vascular via receptor CD44 e Anexina A2, e fatores de transcrição do sistema RhoA, ativados pelos receptores PAR (modificado de TERMEER, 2000).

Figura 4: Esquema simplificado do vetor de armazenamento com o inserto Hyal-1, pDTSmart-Hyal-1, com sítios de restrição (*BamH-1* e *Not-1*), e gene de resistência à kanamicina.

Figura 5: Esquema simplificado do vetor de expressão com o inserto da hyal-1, pET-28-a-Hyal-1; com cauda de histidina (poli-his), códons de início (ATG) e término (TGA), sítios de restrição (*BamH-1* e *Not-1*), e gene de resistência à kanamicina.

Figura 6: Representação do resultado da reação de seqüenciamento do plasmídeo pIDTSmart com o inserto do cDNA da Hyal-1, variante 8, análise no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*.

Figura 7: Fotografia do gel de agarose 8% da eletroforese mostrando os fragmentos do plasmídeo pIDTSmart e inserto do gene da Hyal-1 após restrição enzimática com *BamH-1* e *Not-1*.

Figura 8: Fotografia do gel de eletroforese em agarose 8%, mostrando fragmentos dos produtos de PCR correspondentes ao gene da Hyal-1, variante 8.

Figura 9: Representação do resultado da reação de seqüenciamento do plasmídeo pET-28-a-Hyal-1 com o inserto do cDNA da Hyal-1, variante 8, análise no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*.

Figura 10: Fotografia da eletroforese em poliacrilamida 12%, destacando as bandas com tamanho de 45 kDa das amostras em tempos 0, 1, 2, e 4 horas após indução da expressão.



Figura 11: Fotografia do gel de eletroforese em poliacrilamida 12%, em destaque as bandas com tamanho de 45 kDa das amostras em tempos 0 e 8 horas após a indução da expressão, a temperatura ambiente.

Figura 12: Fotografia da membrana do *Western blotting*, em destaque as bandas com tamanho de 45 kDa das amostras em tempos 0, 2 e 4 horas após a indução da expressão à 38°C e 0 e 8 horas após a indução à temperatura ambiente.

Figura 13: Fotografia da membrana do *Western blotting* das amostras antes e depois da lise por ultra-som, respectivamente, em destaque a banda com tamanho de 45 kDa presente apenas na amostra do sedimentado após a lise, que contém a fração insolúvel, com os corpos de inclusão.

Figura 14: Fotografia do gel de eletroforese em poliacrilamida 12%, em destaque as bandas com tamanho de 45 kDa das amostras das frações de eluição 1 e 2 das amostras e das passagens do gradiente de uréia durante a purificação por cromatografia líquida em coluna de níquel-agarose.

Figura 15: Fotografia da membrana do *Western blotting* das amostras depois da purificação em cromatografia líquida em coluna de níquel-agarose, as amostras 1 e 2 correspondem às frações de eluição, e as amostras 3 e 4

são as frações de lavagem da coluna, mostrando que não ocorreu reconhecimento nenhum nestas amostras. Em destaque as bandas com tamanho de 45 kDa.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                |   |
|----------------|---|
| µg             | Micro grama   |
| µL             | Micro litro   |
| ANOVA          | Análise de variância                                      |
| ATP            | Adenosina tri-fosfato                                     |
| <i>BamH-I</i>  | Endonuclease de restriçãoBamHI                            |
| BL-21          | Linhagem de bactéria <i>Escherichia Coli</i> BL-21        |
| CD44           | Receptor de membrana celular                              |
| cDNA           | Ácido desoxirribonucleico complementar                    |
| CIBio          | Comissão Interna de Biossegurança                         |
| CHAPSO         | 3-cholamidopropildimetilamonio2-hidroxi1-propanosulfonato |
| C-terminal     | Carboxiterminal   |
| DEMEM          | Meio de cultura DEMEM                                     |
| DNA            | Ácido desoxirribonucleico                                 |
| dNTP           | Desoxirribonucleotídeos fosfatados                        |
| DO             | Densidade óptica  |
| DTT            | Ditiotreitol  |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>                                   |
| EDTA           | Ácido etilenodiaminatetracético                           |
| E-SELECTINA    | Molécula de adesão leucócito-endotelial                   |
| FCF            | Faculdade de Ciências Farmacêuticas                       |
| FDA            | <i>Food and Drug Administration</i>                       |
| GAGS           | Glicosaminoglicanos                                       |
| HA             | Ácido Hialurônico   |
| HPLC           | Cromatografia Líquida de Alta Pressão                     |

|              |   |
|--------------|---|
| Hyal         | Hialuronidase   |
| ICAM1        | Molécula de adesão intracelular                           |
| IgG          | Imunoglobulina G  |
| IL-6         | Interleucina-6  |
| IPTG         | Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosideo                    |
| kDa          | Quilo Daltons   |
| L            | Litro   |
| L929         | Linhagem celular de fibroblastos L929                     |
| LB           | Luria Bertami   |
| LBMAD        | Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico |
| M            | Molar   |
| mM           | Mili molar  |
| MEC          | Matriz extra celular                                      |
| mL           | Mili litro  |
| mRNA         | Ácido ribonucléico mensageiro                             |
| NaCl         | Cloreto de sódio  |
| NCBI         | <i>Nacional Center for Biotechnology Information</i>      |
| Ng           | Nano gramas   |
| nL           | Nano litro  |
| nM           | Nano molar  |
| <i>Not-I</i> | Endonuclease de restrição NotI                            |
| N-terminal   | Aminoterminal   |
| °C           | Graus Celcius   |
| OGM          | Organismo geneticamente modificado                        |
| PAR          | Receptores de protease ativada                            |
| Pb           | Pares de bases nitrogenadas                               |

|                  |  |
|------------------|--|
| PCR              | Reação em cadeia pela polimerase                         |
| PECAN-1          | Molécula de adesão endotelial-plaquetária-1              |
| pET-28-a         | Plasmídeo pET-28-a                                       |
| pET-28-a-Hyal-1  | Plasmídeo pET-28-a com inserto Hyal-1                    |
| pH               | Potencial Hidrogeniônico                                 |
| PH-20            | Isoforma da Hialuronidase                                |
| pIDTSmart        | Plasmídeo pIDTSmart                                      |
| pIDTSmart-Hyal 1 | Plasmídeo pIDTSmart-Hyal-1                               |
| PMSF             | Fenilmetilsulfonilfluoridro                              |
| RhoA             | Fator de transcrição                                     |
| RPM              | Rotações por minuto                                      |
| SDS-PAGE         | Eletroforese em gel poliacrilamida sódio-dodecil-sulfato |
| SOC              | Meio de cultura SOC                                      |
| T4 DNA ligase    | Enzima T4 DNA ligase                                     |
| TBE              | Tris/Borato/EDTA   |
| Tm               | Temperatura de <i>melting</i> (desnaturação)             |
| TNF- $\alpha$    | Fator de necrose tumoral- $\alpha$                       |
| TOP10F           | Linhagem de bactéria <i>Escherichia Coli</i> TOP10F      |
| Tris CL          | Tris cloro   |
| U                | Unidades enzimáticas                                     |
| VCAM1            | Molécula de adesão celular-vascular                      |

## **RESUMO**

## Resumo

**Del Moanco, A, D M. Subclonagem, expressão e purificação da enzima Hialuronidase-1, variante 8, humana. 2013. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.**

O Ácido Hialurônico, HA, é um dos principais componentes da matriz extracelular dos vertebrados. É um glicosaminoglicano hidrolisado pelas enzimas da família da Hialuronidase, envolvidas na regulação de importantes processos biológicos, como a permeabilidade vascular e a angiogênese. Conforme o interesse pelo desenvolvimento de uma rota de síntese para esta enzima, objetivamos a obtenção de um plasmídeo, contendo a sequência que codifica a variante 8 do gene *Hyal-1*. Para isto, planejou-se a inserção de dois sítios de restrição para a sub-clonagem, sítio dirigida, *BamH-1* na região 5' e *Not-1* na 3' na sequência do códon da *Hyal-1*. O inserto foi sub-clonado no plasmídeo, pET28-a, e transfectado para expressão em *Escherichia coli* BI-21. A expressão foi induzida por IPTG no melhor tempo, de 4 horas, e a confirmação da expressão protéica foi realizada por *Western blotting*. Observou-se uma proteína de 45 kDa, confirmando a presença da Hyal-1. Realizou-se a expressão em 4 litros de cultura para obtenção de uma quantia suficiente para purificação em coluna de níquel-agarose. O rendimento neste experimento foi de 25µg por litro. A rota sintética sugerida neste estudo mostrou-se eficiente para obtenção da proteína Hyal-1 recombinante, justificando futuros investimentos na otimização deste processo.

Palavras chave: Sub-clonagem, Hialuronidase, plamídeo sintético.

## **ABSTRACT**



**Del Moanco, D M A. Subcloning, expression and purification of Human Hialuronidase-1, variant 8. 2013. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.**

**ABSTRACT:**

Hyaluronic Acid, HA is a major component of the extracellular matrix of vertebrates. It is a glycosaminoglycan hydrolyzed by enzymes of the hyaluronidase family, involved in the regulation of important biological processes such as angiogenesis and vascular permeability. As interest in the development of a synthesis route for this enzyme, we aim to obtain a plasmid containing the coding sequence of the gene variant 8 Hyal-1. To obtain the plasmid insert was planned and two restriction sites for sub-cloning site directed at the 5 'Bam H-1' and 3 'Not-1 in codon sequence of Hyal-1. The insert was sub-cloned into plasmid pET28-a, and transfected for expression in Escherichia coli BI-21. The expression was induced by IPTG in the best time of 4 hours and confirmation of protein expression was performed by Western blotting. There was a 45 kDa protein, thus confirming the presence of Hyal-1. Purification was performed on nickel agarose column to obtain a larger amount of the protein, approximately 25µg/L. The route suggested in this study was efficient attainment of Hyal-1 recombinant protein.

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A matriz extracelular e o ácido hialurônico.

A matriz extracelular (MEC) é uma estrutura que surgiu evolutivamente, a partir dos organismos pluricelulares, com a função de promover a estruturação dos tecidos, conferindo flexibilidade e coesão entre as células. Seus componentes principais são os Glicosaminoglicanos (GAGS): proteínas unidas covalentemente a cadeias polissacarídeas conhecidas como proteoglicanos, as proteínas fibrosas, como colágeno e elastina, e adesivas, como fibronectina e laminina (JAMES, 2005; STEVENS, 2013). Variações na organização e composição destes componentes dão a conformidade específica de acordo com as propriedades necessárias de cada tecido. Assim a matriz pode assumir importantes papéis na diferenciação, proliferação, migração e função celular (TURNER, 1989).

Dentre os mais importantes componentes da MEC está o ácido hialurônico (HA), que está presente em praticamente todos os tecidos e fluidos de organismos superiores, como no cordão umbilical, no líquido seminal, na cartilagem, entre outros. Nos mamíferos cerca de 50% de todo HA é encontrado nas camadas logo abaixo da epiderme (CHENG, 2011). Os polímeros de HA são sintetizados no lado citossólico da membrana celular pela enzima hialuronan-sintase. O processo de translocação dos polímeros de HA, os quais são extremamente hidrofílicos, através da membrana celular não foi descrito ainda (HUBBARD, 2012).

O HA é um glicosaminoglicano que pode ser hidrolisado na presença da enzima Hyaluronoglucosaminidase ou Hialuronidase (GMACH, 2003; HYNES,

2000; ZHANG, 2001); e está relacionado diretamente à diversas funções, entre elas a adesão e migração de leucócitos nos tecidos conectivos, principalmente linfócitos-T, os quais são importantes mediadores da resposta imunológica. Assim, o HA pode ter um papel importante na função das células T e sua interação com outros tecidos, principalmente durante o processo inflamatório (EVANKO, 2012).

Além de compor a MEC, o HA é um dos compostos que atua como lubrificante no líquido sinovial. Estudos *in vitro* demonstraram que sua presença melhora a capacidade dos condrócitos de produzir matriz extracelular (BLAND; COOPER, 1984; MCGINTY, 1996). Desse modo, o HA está diretamente relacionado a várias propriedades essenciais da manutenção do equilíbrio homeostático e metabólico em animais, atuando na circulação de nutrientes, hormônios e outros sinalizadores químicos (JUNQUEIRA, 2008).

## **1.2 A família das Hialuronidases e suas características.**

A Hialuronidase (Hyal) é uma enzima que foi descoberta em 1928 por Raynalds e colaboradores. Mas somente em 1953 que sua função de facilitar o transporte de moléculas através da MEC foi descoberta por Meyer e colaboradores. Alguns anos mais tarde a enzima recebeu o nome de Hialuronidase (FISZER-SZAFARZ, 1984) Sua estrutura tridimensional está representada na figura 1, a seguir.

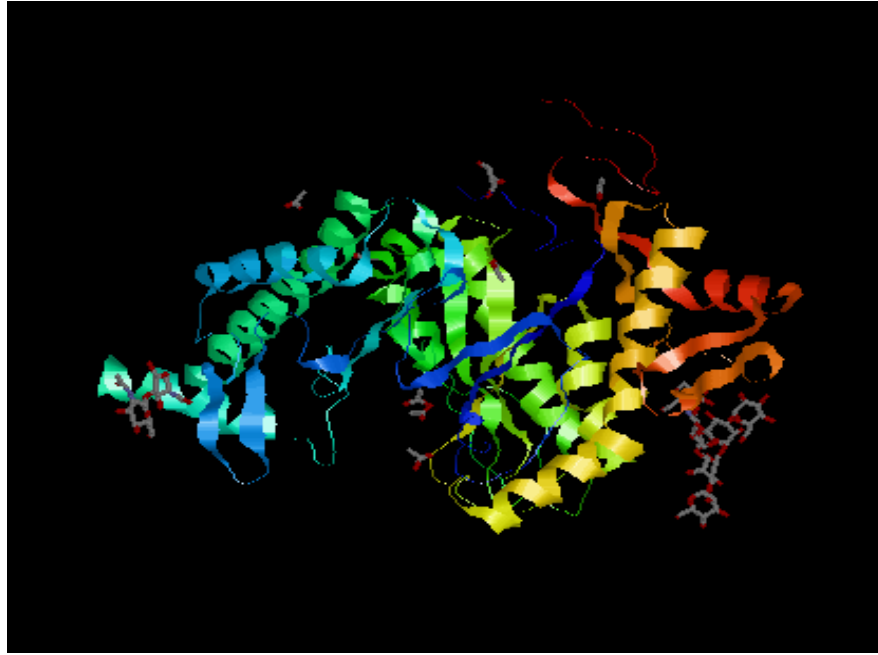


Figura 1: Hyal-1. Estrutura tridimensional proposta para a Hyal-1, extraída do banco de dados de estruturas de proteínas PDB (<http://www.rcsb.org/pdb>).

As enzimas dessa família hidrolisam a ligação entre N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina e resíduos de D-glucuronato nos polímeros de ácido hialurônico, e também catalisam a hidrólise de ligações 1,4- $\beta$ -D-glicosídicas entre N-acetilgalactosamina e ácido glucurônico na condroitina. Não se sabe ainda porque a ligação  $\beta$ 1,3 não é clivada da mesma forma (LING, 2009; TRIGGS-RAINE, 1999).

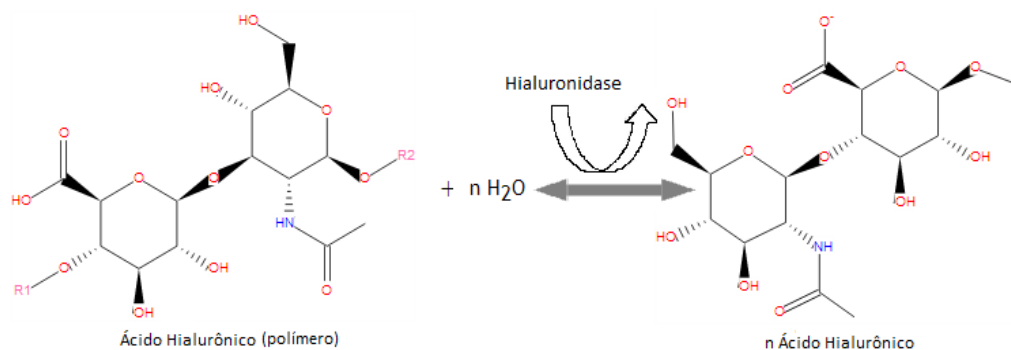


Figura 2: Hidrólise do Ácido Hialurônico catalisada pela enzima Hialuronidase (modificado do banco de dados UniProtKB®).

Tais enzimas estão envolvidas em diversos processos biológicos, dentre eles o aumento da permeabilidade vascular devido à fragmentação do HA e consequente diminuição da adesão célula-célula (TERMEER, 2000), como mostra a figura 3.

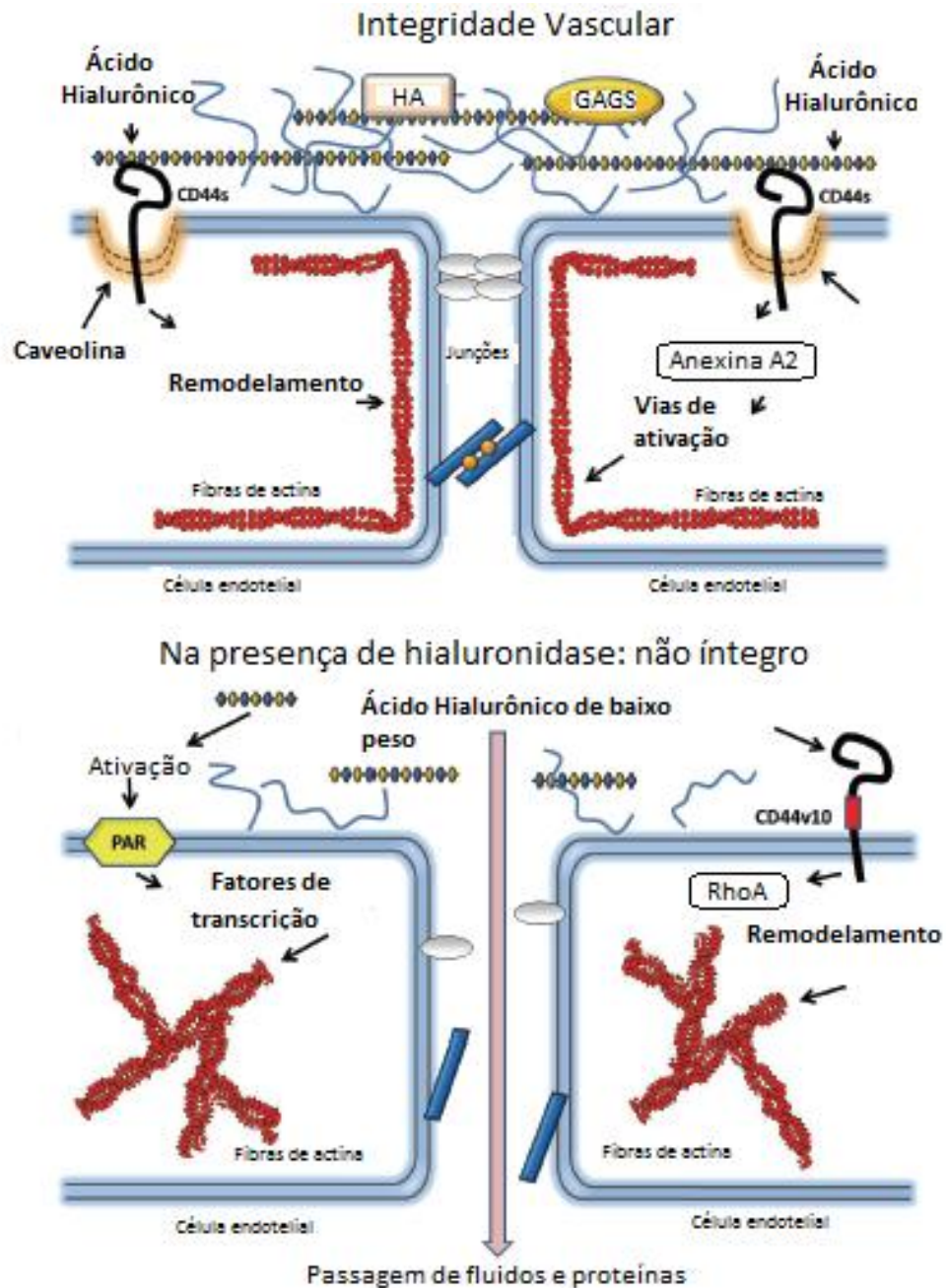


Figura 3: Esquema representativo da clivagem dos polímeros de alta massa molecular HA na superfície celular pela Hialuronidase em fragmentos de menor peso molecular. Reorganização das fibras de actina com o consequente aumento da permeabilidade vascular via receptor CD44 e Anexina A2, e fatores de transcrição do sistema RhoA, ativados pelos receptores PAR (modificado de TERMEER, 2000).

Esta reação é temporária e reversível em condições fisiológicas. Após a ação destas enzimas sobre o HA ocorre a formação de inúmeros oligossacarídeos, porém o tecido pode recuperar sua estrutura convencional entre dois a quatro dias (FARR, 1997). Uma propriedade bem interessante destas enzimas é a de não possuir efeito algum na barreira hematoencefálica, diferente das enzimas colagenase, da pronase e da pepsina, as quais conseguem ultrapassar a barreira (JUNG, 2010; PRESTON, 2013).

Em humanos existem cinco isoformas desta enzima: os genes *Hyal-1*, -2 e -3 encontram-se no cromossomo 3p21.3 e outros dois genes *Hyal-4* e *PH-20* que, por sua vez, estão no cromossomo 7q31.3. O gene de *Hyal-1* codifica uma proteína de 435 aminoácidos, a qual apresenta mais de 40% de identidade com PH-20 (CSOKA, 2001). Enquanto as proteínas *Hyal-2* e a *PH-20* encontram-se ligadas à membrana celular pela glicosilfosfatidil inositol, que é uma proteína âncora, a *Hyal-1* é encontrada inteiramente de forma solúvel (FROST, 1997). *Hyal-2* tem uma porção solúvel e cliva o ácido hialurônico de alto peso molecular em produtos de aproximadamente 20 kDa em aproximadamente 50 unidades de dissacarídeos; já a *Hyal-1* cliva o ácido hialurônico em pequenos dissacarídeos, tendo tetrassacarídeos como produtos principais (JUNG,2010; EL-MEZAYEN, 2013).

Também foram encontrados subtipos de Hialuronidase em procariotos e eucariotos unicelulares. Hialuronidases de diferentes espécies tem diferentes pH ótimos de ação, geralmente ácidos, já que são encontradas nos lisossomos. Nos vertebrados estas enzimas são agrupadas em duas classes: as de atividade neutra, como a *PH-20*, as quais são expressas somente nos

testículos; e as de pH ótimo ácidos, que são encontradas nos outros tecidos, como endotélio, fibroblastos, hepatócitos, entre outros, e são solúveis no plasma. A hialuronidase-1 (Hyal-1) tem o seu pH ótimo em torno de 5.1. Alguns subtipos encontrados em humanos são, Hyal-1, -2, -3, -4 e PH-20. Dentre elas, a Hyal-1 é a única forma solúvel encontrada no plasma (LIN, 1994; PRIMAKOFF, 1984; REITINGER, 2008).

Por ser a única com a propriedade de ser completamente solúvel em plasma, além de ser a isoforma majoritariamente encontrada em humanos, escolhemos a Hyal-1 para alvo de nossos estudos. Tal proteína possui diversas variantes que resultam de diferentes tipos de processamento do mRNA. Dentre as variantes, a 8 corresponde ao transcrito mais longo, com 1324 pb. As 7 e 8 correspondem a mesma isoforma, de mesmo tamanho, porém a de número 7 dispõe de uma discreta modificação na porção 5', se comparada com a variante 8. As variantes 2, 3 e 5 correspondem a transcritos menores com diferentes estruturas, com 1160, 692 e 328 pb, respectivamente, assim como as variantes 1, 4 e 6, estruturalmente diferentes das demais (NCBI, Gene ID:3373, 2013). Deste modo, a Hyal-1, variante 8, foi a isoforma escolhida para ser abordada neste projeto.

### **1.3 As Hialuronidases e algumas aplicações.**

Existem inúmeras aplicações para o uso das diversas isoformas da enzima Hialuronidase, de origem humana ou animal, em forma de extrato ou sintética. Tais aplicações podem ser para pesquisas assim como seu uso como coadjuvante de medicamentos, entre outras aplicações farmacológicas.



Em cultura de fibroblastos e mastócitos a adição de hialuronidase causa um considerável aumento na proliferação celular, sem o comprometimento da maturação dos mesmos. Sabe-se que a expressão do CD44 é importante na proliferação de mastócitos, e que o HA é um dos seus mais importantes ligantes. A deficiência de HA, degradado pela hialuronidase adicionada ao meio, não compromete a proliferação dos mastócitos (TAKANO, 2012).

Este ligante tem sua expressão diminuída em células tumorais, principalmente em melanomas e leucemias (ARHENS, 1993; BIRCH, 2001). A agregação celular, especialmente em tumores, é mediada pelo HA na superfície celular, e sua degradação pela hialuronidase pode influenciar negativamente este processo (KOLAROVA, 1975; NAGY, 2010) diminuindo a densidade celular do tumor e facilitando a progressão de metástases.

A Hyal-1, por ser a única isoforma solúvel, se relaciona diretamente com o crescimento de tumores e progressão de metástases. Sua expressão está relacionada à malignidade tumoral e, por isso, é um dos marcadores de diagnóstico, além de representar um fator molecular determinante do crescimento, invasão e angiogênese (HYMAN, 1955; LOKESHWAR, 2008; ZHANG, 2009). Esta última relação pode ser um interessante foco para futuras pesquisas que envolvam engenharia de tecidos, já que uma das grandes dificuldades enfrentadas é a neovascularização e moléculas que promovam a angiogênese podem ser uma boa estratégia.

O tratamento consagrado para as cicatrizes com formação de quelóide utiliza heparina e alantoína, esta última aumenta a permeabilidade vascular e promove a neovascularização (PEREIRA, 2003), atividades muito semelhantes

às desta enzima. Estudos relacionam a ação da Hialuronidase com o processo de formação de cicatrizes (MOFICOYA, 2012) e, portanto, estudos de novas formulações que permitam o uso tópico da hialuronidase para esta finalidade podem ser interessantes.

A Hialuronidase é encontrada no veneno de várias espécies: abelhas, vespas, escorpiões, serpentes, peixes, moluscos, entre outros animais. Essa presença está ligada ao aumento da absorção das toxinas, potencializando a ação do veneno (AN, 2012; VILAS-BOAS, 2012; VIOLETTE, 2012). Sua relação com os venenos de animais foram encontradas desde as últimas décadas em variadas espécies e continua, até a presente data, a ser descoberta no mundo todo. Peixes da família *Bathracoidae*, gênero *Thalassophryne*, apresentaram, em suas toxinas majoritárias, mais de 30% de homologia com a Hialuronidase dos peixes da família dos *Scorpena*, estes dados não foram publicados.

Assim como ocorre nos acidentes com animais peçonhentos, nos quais a enzima aumenta a absorção dos venenos, a Hialuronidase também é conhecida por aumentar a velocidade de absorção de fármacos, pois aumenta a permeabilidade celular diminuindo a viscosidade do meio extracelular temporariamente. Ocorre também a diminuição da adesão entre as células endoteliais e aumentando a permeabilidade entre as células (MIO, 2001).

Esta propriedade reduz o desconforto durante a administração de medicações intravenosas ou intramusculares, otimizando a reabsorção do excesso de líquido e sangue extravasado nos tecidos. Facilita, também, a passagem de antibióticos injetáveis, da circulação para o líquido sinovial, e

administração de soro fisiológico subcutâneo (MACE, 2013; VAUGHN, 2011). Em cirurgias oftalmológicas o HA é utilizado para proteger a córnea e a Hialuronidase é empregada para tratar alterações na pressão do globo ocular e para potencializar a ação de anestésicos (FECHNER, 1997; GHALI, 2012; HUBBART, 1997). Esta enzima é utilizada em cirurgias plásticas e dentárias para minimizar a formação de cicatrizes (BARING, 2011; CHOLE, 2011). Também foi efetiva no tratamento de extravasamentos vasculares (MODENA, 1998), acelerando a reabsorção e degradação do hematoma de forma rápida.

Outra aplicação interessante consiste no isolamento de células-tronco de cordão umbilical para seleção e cultura (SALEHINEJAD, 2012; WU, 2013). Encontramos diversas aplicações médicas interessantes para a Hialuronidase e um crescente potencial comercial. Além das aplicações médicas, a Hialuronidase PH-20 é utilizada, em medicina veterinária e zootecnia, como um importante adjuvante em inseminações artificiais (REMPEL, 2011). Não foram ainda publicados estudos que relacionem a utilização de Hialuronidase humana na tecnologia de reprodução assistida, para facilitar o processo de fixação embrionária ao endométrio, esta também pode ser uma aplicação.

Micropartículas poliméricas contendo Hialuronidase mostraram grande potencial como carregador de fármacos, antibióticos injetáveis, anti-proliferativos direcionados, corticóides, anestésicos, entre outros (DIELEMAN, 2012; ENGSTROM, 1998; WOHLRAB, 2012). A utilização em conjunto com polímeros de liberação controlada de fármacos, como os anticoncepcionais e insulina, também tem aplicação importante (HOMPESCH, 2012; VAUHG, 2011).

As reações de hipersensibilidade a hialuronidase injetável são raras, porém alguns casos de reações anafiláticas já foram relatados. Tais situações ocorreram principalmente após sensibilização primária, durante a segunda administração, especialmente quando na forma de extratos. Casos de anafilaxia após a primeira administração são raros, porém possíveis (LEE, 2011; LYALL, 2012).

Assim, a isoforma PH-20 é comercializada por diversos laboratórios na forma de extrato purificado, sendo obtida através do processamento de testículos bovinos, purificada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). A enzima pH-20 bovina é comercializada hoje em dia com o nome fantasia de Hyalozima pelo laboratório APSEN. A enzima PH-20 humana já foi sintetizada pelo laboratório Baxter U.S. e aprovada pela FDA em 2008 (BAXTER, 2008). Os laboratórios Bioclone inc., produzem a Hyal-1 recombinante para uso *in vitro* somente, porém não informam qual a variante produzida e não possuem aprovação da FDA para utilização clínica. Outras isoformas não tiveram sua rota de síntese bem desenvolvida. Pode-se acreditar que as reações alérgicas a estas administrações de pH-20 bovina seriam minimizadas com o uso da isoforma humana solúvel, produzida pela tecnologia do DNA recombinante.

#### **1.4 A tecnologia do DNA recombinante.**

Em 1972, Berg e colaboradores realizaram a primeira experiência que permitiu a ligação de um fragmento de DNA humano à outra molécula de DNA bacteriano. Seis anos mais tarde, em 1978, os pesquisadores Arber, Nathans e

Smith receberam o prêmio Nobel da Medicina pelo desenvolvimento da tecnologia da restrição enzimática. Desde então a tecnologia do DNA recombinante permitiu inúmeros avanços importantes na pesquisa científica (Nobel Prize, 2013).

Começam a surgir os termos “Engenharia genética” e “DNA Recombinante”, e com isso questões éticas passam a ser levantadas (CANDEIAS, 1991). Desta maneira pode-se definir DNA recombinante como sendo um sistema artificial contendo uma sequência de oligonucleotídeos que flanqueia uma sequência que, por sua vez, codifica um peptídeo ou uma sequência de proteína. DNAs de organismos diferentes podem ser fusionados, de forma a alterar características pré-existentes ou introduzir nova característica estabelecendo o que chamamos de “organismo geneticamente modificado” (OGM) (LEHNINGER, 2011).

Os primeiros organismos a receber um fragmento de DNA exógeno, a partir desta técnica, foram as bactérias *Escherichia coli*; e a primeira proteína sintetizada foi a Insulina, no final da década de 1970. A partir do isolamento do RNA mensageiro do gene que codifica a Insulina, realiza-se uma cópia por ação da enzima transcriptase reversa que, a partir de uma fita simples obtém-se o DNA híbrido complementar (uma fita de DNA e outra de RNA (cDNA). Este então pode ser expandido pela reação em cadeia pela polimerase (PCR). O fragmento consegue, então, ser inserido num plasmídeo (DNA circular artificial, que contém todos os elementos necessários para serem transcrito e traduzidos e, por sua vez, podem ser transfectados em bactérias *Escherichia coli* estabelecendo uma bactéria recombinante (OGM) (CANDEIAS, 1991). Como

as bactérias possuem elevada taxa de reprodução e replicação, são capazes de produzir elevadas quantidades de proteínas, as quais, após serem extraídas e purificadas, podem ser utilizadas para diversos fins.

Portanto, por ser o primeiro, mais simples, e mais estudado até os dias de hoje, escolhemos a *Escherichia coli* como organismo que receberá o plasmídeo comercial que contem o fragmento correspondente ao cDNA do gene da proteína Hyal-1, variante 8.

## **2. OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral:**

Obtenção de Hialuronidase recombinante, variante 8 produzida em *Escherichia coli*.

### **2.2 Objetivos Específicos:**

Obtenção do inserto codificante do cDNA da *Hyal-1*, variante 8, em um plasmídeo comercial, com inserção dos sítios de restrição das enzimas *BamH-I* e *Not-I*.

Subclonagem, sítio dirigida, no plasmídeo de expressão, fusionada a cauda de poli-histidina, para separação.

Expressão em *Escherichia coli* e purificação da proteína recombinante em coluna de níquel-agarose.

Quantificação e avaliação do rendimento.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Síntese dos oligonucleotídeos e obtenção do inserto:

Foi sintetizada a sequência correspondente ao cDNA do gene da enzima Hyal-1, variante 8, com 1324 pb (Integrated DNA Technologies ®, Iowa USA). Foram inseridos, nas extremidades 5' e 3' respectivamente, as sequências para os sítios de restrição das enzimas *BamH-I* e *Not-I*, escolhidas por não estarem presentes em nenhum dos plasmídeos utilizados e nem no inserto, conforme analisado pelo programa NEBcutter®, fornecido pelo fabricante das enzimas de restrição (New England BioLabs Inc., Beverly, MA, EUA).

A partir do inserto sintetizado, clonado no plasmídeo pIDT-smart® (Integrated DNA Technologies ®, Iowa USA), obteve-se o plasmídeo recombinante de armazenamento pIDTsmart-Hyal-1, conforme figura 4, para sequente expansão e subclonagem, sitio dirigida, no plasmídeo pET28-a, para expressão.

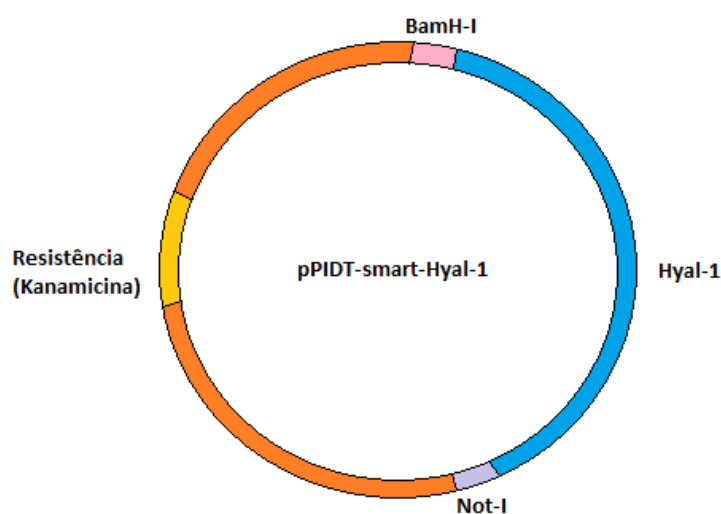


Figura 4: Esquema simplificado do vetor de armazenamento com o inserto Hyal-1, pIDTsmart-Hyal-1, com sítios de restrição (*BamH-I* e *Not-I*), e gene de resistência à kanamicina.

### **3.2 Transformação bacteriana, expansão do plasmídeo e restrição enzimática:**

Foram utilizadas bactérias *Escherichia coli*, de linhagem Top-10F, tratadas com cloreto de cálcio a 0,1M (Sambrook & Russel, 2001), para se tornarem quimiocompetentes, e, assim, transformadas por choque térmico, para inserção dos vetores pDTSmart-Hyal-1, que continham o inserto.

Para cada 100µL de bactérias competentes foram adicionados 10µL do plasmídeo pDTSmart-Hyal-1, em um tubo de cultura de 15mL. A mistura foi incubada em banho de gelo por 30 minutos e em seguida incubada a 42°C, por 90 segundos, e novamente resfriada por 2 minutos em banho de gelo.

Ao tubo contendo a mistura foram adicionados 900µL de meio SOC gelado, meio Luria Bertani (LB) líquido contendo glicerol a 40mM e cloreto de magnésio a 20mM, e após homogeneização cuidadosa, coloca-se a cultura a 37°C por 45 minutos com agitação constante à 50 rpm. Em placas de Petri contendo LB ágar e o antibiótico kanamicina na concentração de 100µg/mL foram semeados 500, 200, 100, 50 e 20µL da cultura. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

As colônias com características de crescimento adequado nesse meio foram repicadas em 5mL de meio LB líquido contendo kanamicina a 100µg/mL. Após incubação a 37°C por 16 horas, a 160 rpm, foi realizada a obtenção das células para posterior purificação dos plasmídeos recombinantes utilizando o *Plasmid Mini Kit* (Qiagen® Strasse, Hilden, Germany) conforme instruções do fabricante.

Aproximadamente, 10µg de cada plasmídeo, pIDTsmart-Hyal-1, foram digeridos com 10U da enzima *Bam*HI e *Not*I (New England BioLabs Inc., Beverly, MA, EUA), 5µL de tampão 10X e água deionizada estéril em um volume final de 50µL por 4 horas a 37°C. Esta reação ocorreu de forma simultânea, conforme orientado pelo fabricante, já que as duas enzimas escolhidas utilizam o mesmo tampão permitindo a restrição enzimática desta forma com eficiência próxima aos 100%. Os fragmentos da restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 0,5X; e os fragmentos de interesse, com tamanho de aproximadamente 1325 pb, foram purificados do gel empregando o kit Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band (GE Healthcare®, Buckinghamshire, Inglaterra). Prosseguiu-se com a ligação com o plasmídeo de expressão pET-28-a, também previamente clivado com as mesmas enzimas de restrição, de acordo com a mesma metodologia descrita neste item.

### **3.3 Subclonagem nos vetores de expressão:**

Realizamos, então, a subclonagem nos vetores de expressão pET-28-a<sup>®</sup>, que está sob o controle do promotor T7, (Merck KGaA®, Darmstadt, Alemanha), e ainda contém o códon de cauda de polihistidina para facilitar a purificação.

Os produtos das reações de restrição purificados correspondentes ao fragmento do gene da Hyal-1 foram ligados ao vetor pET28a, utilizando inserto e vetores na relação molar de 3:1, tampão da Ligase contendo ATP (1X), 1U da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA), e água deionizada

estéril em um volume final de 20µL. A reação de ligação foi incubada por 12 horas, a temperatura ambiente.

Os produtos dessa ligação, pET-28-a-Hyal-1, conforme figura 5, foram usados para transformar células de *Escherichia coli* BL-21 competentes tratadas com cloreto de cálcio 0,1M (Sambrook & Russel, 2001). A transformação bacteriana foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.

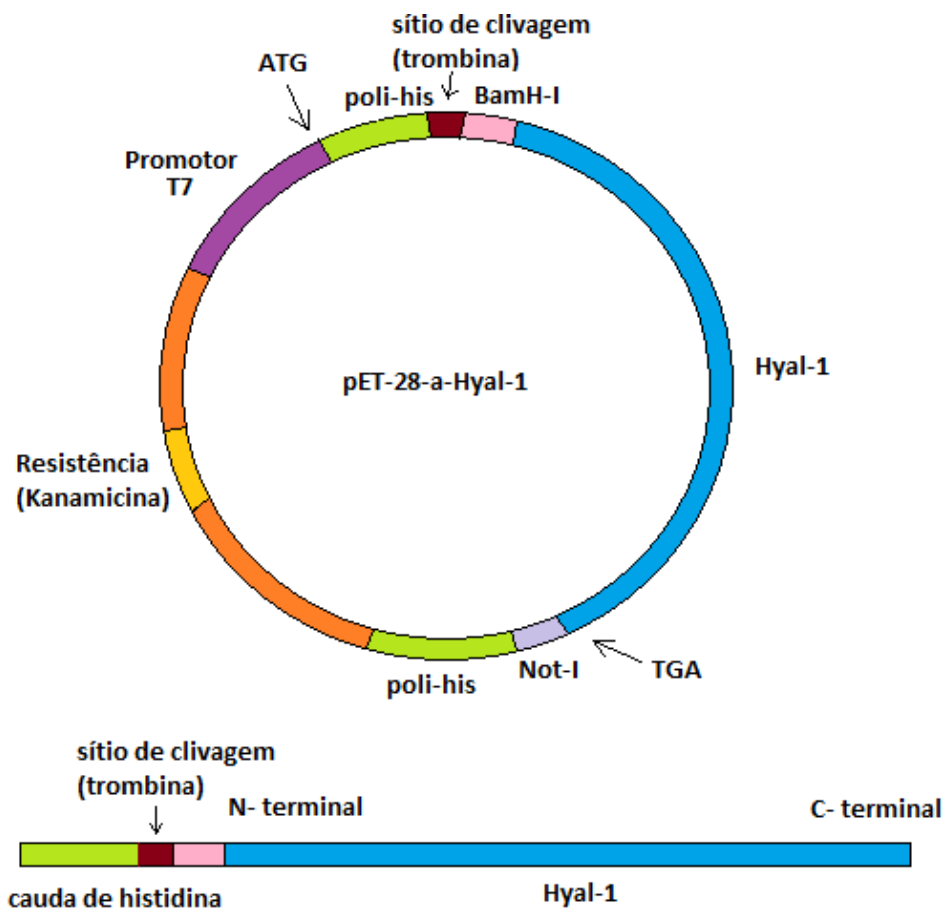


Figura 5: Esquema simplificado do vetor de expressão com o inserto da Hyal-1, pET-28-a-Hyal-1; com cauda de histidina (poli-his), códons de início (ATG) e término (TGA), sítios de restrição (BamH-I e Not-I), e gene de resistência à kanamicina.

### 3.4 Identificação dos clones com a sequência da Hyal-1:

Para identificação dos clones que continham a sequência do gene transcrito da Hyal-1, realizou-se a amplificação dos fragmentos pela PCR. Para tal processo utilizamos 0,2µL da enzima Platinum Taq® DNA polimerase e 5µL de tampão (Invitrogen, Carlsbad. EUA), 200µM de cada dNTP (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), 1µL de amostra, à uma concentração de aproximadamente 300ng/µL, além de 200nM de cada oligonucleotídeo iniciador (Integrated DNA Technologies ®, Iowa USA), como mostra a tabela 1, em termociclador Verity (Applied Biosystem, Foster City, CA).

O programa utilizado parte de 5 minutos a 95°C por um ciclo; segue com 40 ciclos de 95°C por 1 minuto para desnaturação; 63°C por 1 minuto para hibridização; 72°C por 1 minuto e 30 segundos para a etapa de extensão e, por fim, um último ciclo de 72°C por 10 minutos para a realização da extensão final do fragmento.

Tabela 1: Fitas senso e anti-senso dos oligonucleotídeos sintetizados e suas respectivas sequências iniciadoras e temperaturas de desnaturação.

|                 | Oligonucleotídeo  | Tm (C) |
|-----------------|---|--------|
| Fita-senso      | 5´ - CGC <b>G´GATCC</b> ATG GCA GCC CAC CTG CTT C-3´              | 63,0   |
| Fita anti-senso | 5´ - AAAAGGAAAA <b>GC´GGCCGC</b> TCA CCA CAT GCT CTT CCG CTC - 3´ | 63,2   |

As sequências dos iniciadores foram escolhidas utilizando o programa Primer Premier 5.0 (Premier Biossoft International®, Palo Alto, CA, EUA). Os

produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% utilizando TBE 0,5X.

### **3.5 Sequenciamento de DNA:**

Os plasmídeos pIDTsmart-Hyal-1 previamente selecionados foram submetidos ao sequenciamento de DNA para a confirmação dos clones que continham os fragmentos de interesse. Tal etapa foi realizada no Centro de Estudos do Genoma Humano (Instituto de Biociências, USP, São Paulo, Brasil) utilizando o equipamento ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA) e o kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, de acordo com as instruções do fabricante.

As sequências foram analisadas, para confirmação da clonagem. Numa primeira análise no Instituto de Biociências utilizando o software *Sequencing Analysis* 5.3.1, e posteriormente, no laboratório, utilizando o teste de alinhamento do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*®.

### **3.6 Determinação das melhores condições para expressão da Hyal-1:**

As colônias de bactérias contendo os plasmídeos, pET-28-a-Hyal-1, selecionados foram repicadas em 5mL de meio LB líquido contendo kanamicina, a 100µg/mL, e incubadas a 37°C, 160rpm, por até 12horas.

Após esse período, um novo repique foi feito em 10mL de meio LB em tubos de polipropileno de 15mL, com kanamicina na diluição 1:100, os quais

foram incubados a 37°C, 160rpm, até a fase logarítmica de crescimento, com uma densidade óptica entre  $DO_{600} = 0.5$ . Nesse momento, a expressão da proteína recombinante foi induzida utilizando IPTG (isopropil- $\beta$  D-tiogalactosídeo) em gradiente para padronização com as concentrações de 0,1mM a 10mM, e as células novamente incubadas por um período adicional de 3–5horas a 37°C, 160rpm.

Foi realizada também uma incubação de 8 horas a temperatura ambiente, 150rpm, para testar a expressão em taxa metabólica menor. Nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 horas de indução foi retirada uma alíquota da amostra para a análise da expressão.

As alíquotas de 2mL de cultura foram centrifugadas a 14000rpm por 1 minuto a 4°C, o sedimento ressuspendido em 6 $\mu$ L do tampão de amostra e incubados à 100°C por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de concentração 12%.

Após a determinação da melhor condição, uma colônia de *Escherichia coli*, contendo a construção recombinante pET-28-a-Hyal-1, foi inoculada em 50mL de meio LB líquido contendo 100 $\mu$ g/mL de kanamicina, a 37°C, 160rpm, por 12 horas. No dia seguinte, foi realizado um repique de 2,5 $\mu$ L em 250mL de novo meio LB líquido foi feito, utilizando os 50mL da cultura *overnight*, mesma diluição 1:100, com kanamicina (100  $\mu$ g/mL) e a cultura foi incubada a 37°C, 160rpm, com agitação até a fase logarítmica de crescimento ( $DO_{600}=0.5$ ).

Nesse momento, a indução da expressão foi realizada utilizando IPTG 1mM. No melhor tempo de indução determinado na etapa anterior, com a maior quantidade de proteína expressa, as células foram recuperadas por



centrifugação, ressuspensas em tampão PBS e lisadas com Lisozima (1 mg/mL). Foram realizadas um total de 8 garrafas com 250 mL de cultura, totalizando 4 litros, para purificação.

### **3.7 Confirmação da expressão:**

A metodologia utilizada para confirmar a expressão da proteína foi o *Western blotting*. Os clones que possivelmente expressaram a proteína foram cultivados conforme descrito anteriormente nas etapas 3.4 e 3.5, nas melhores condições encontradas. Foi centrifugado 1mL de cultura e o sedimentado ressuspensado em 3 $\mu$ L de tampão de corrida (dodecil sulfato de sódio e beta-mercaptanol). Esta alíquota foi separada em SDS-PAGE 12%. e transferida para uma membrana de nitrocelulose, por 90 minutos a 100 V.

Após a transferência semi-seca a membrana foi bloqueada por 90 minutos em solução de bloqueio (2,5% BSA, 5% Leite em pó, PBS 30mL) em agitação constante à temperatura ambiente. Após esta etapa, a membrana foi incubada com 1mL de anticorpos primários anti-histidina (kit HisProbe-HRP Thermo Scientific, USA) por 10 minutos, concentração de 1:2000, no equipamento Snap-ID® (Millipore, USA) após a lavagem a vácuo, com 45 mL de tampão PBS (Cloreto de sódio, Fosfato de sódio monobásico e Fosfato de sódio dibásico), incubada com 1mL de anticorpos secundários conjugados (anti-camundongo igG) marcados com peroxidase, concentração 1:1000, e uma segunda lavagem a vácuo, nas mesmas condições descritas anteriormente.

Por fim, a membrana foi incubada por 2 minutos com a solução de revelação (kit Western Blotting Thermo Scientific®, USA) e a quimioluminescência foi lida, a imagem adquirida pelo equipamento DNR MF Chemi-Bis (DNR Bio-ImagingSystems®, USA).

### **3.8 Purificação da proteína:**

A purificação das proteínas expressas pelas bactérias transformadas com o vetor pET-28-a-Hyal-1 foi realizada utilizando em coluna de Níquel-agarose. Um total de quatro litros de cultura, iniciais, foram centrifugados e ressuspensos em tampão de lise (Tris-HCL pH8 1M, EDTA, 0,5M, PMSF 1M, NaCl, 5M e Lisozima), lisados por ultra-som por 10 minutos e centrifugados novamente à 10.000 rpm, 45 minutos à 4°C para a purificação. As frações foram analisadas em gel SDS-PAGE 12%, e *Western blotting*, para confirmar qual fração apresentava a proteína de interesse, da mesma forma descrita no item 3.7.

Após esta determinação, o sedimentado, fração que continha as proteínas em corpos de inclusão, foi lavado 4 vezes em tampão (Tris-HCl pH8 1M, CHAPSO 0,5%) centrifugado a 14000rpm por 10 minutos, os sobrenadantes foram analisados em SDS-PAGE 12% e não continham a proteína. O sedimentado restante foi ressuspensionado em tampão (Tris-HCl pH8 1M, NaCl 5M, Uréia 6M, Glicerol 10%), incubado à 37 °C por 2 horas, para desfazer os corpos de inclusão. Após a incubação foi realizada uma nova centrifugação a 14000rpm por 30 minutos 4°C, por fim, sobrenadante e sedimentado foram analisados também em SDS-PAGE 12%.

A fração que continha a proteína, que compreende aos corpos de inclusão que foram lisados pela uréia 6M, presente no tampão (Tris-HCl pH8, 1M, NaCl 5M, Uréia 6M, Glicerol 10%), foi purificada em coluna de níquel-agarose. Durante esta etapa a coluna foi lavada primeiro com 10mL de água destilada, 10mL de tampão de equilíbrio (20mM de Tris-HCl pH8, 5M de NaCl, 5mM de Imidazol, 6M de uréia e 10% de Glicerol), amostra contendo a proteína é passada duas vezes e, após esta etapa, é passado o tampão de lavagem 10mL (20mM de Tris-HCl pH8, 5M de NaCl, 20mM de Imidazol, 6M de uréia e 10% de Glicerol). Em seguinte, passamos as soluções tampão de renaturação (20mM de Tris-HCl pH8, 5M de NaCl, 20mM de Imidazol, 10% glicerol, 0,1% Triton, 0,5mM GSSH, 0,5mM GSH), com gradiente de 6M, 4M, 2M, 1M, 0,5M e 0M de uréia, 5mL cada.

Por fim, é adicionado de 5mL tampão de eluição (3,5mL de tampão de renaturação e 1,5mL de Imidazol), foram analisadas novamente em SDS-PAGE 12% e mostram a presença da proteína pura. Após esta etapa, as amostras foram dializadas em solução (50mM Tris-HCl pH8, 50mM NaCl, Glicerol 50%, 0,1 mM DTT, 0,1mM PMSF e 500mL água destilada), com agitação e à 10°C, e quantificadas (kit Pierce BCA Thermo Scientific®, USA).

## **4. RESULTADOS**

## 4.RESULTADOS

### 4.1 Síntese dos oligonucleotídeos e obtenção do inserto:

A síntese química da sequência de interesse, contendo a sequência que codifica o RNAm do gene da Hyal-1, variante 8, inserida no plasmídeo, pIDTSmart, foi confirmada por sequenciamento, conforme a figura 6. A intensidade dos picos no gráfico de absorvância pela base nitrogenada encontrada e a comparação com a sequência padrão, inicialmente pelo Instituto de Biociências utilizando o software *Sequencing Analysis* 5.3.1; e posteriormente, no laboratório, utilizando o teste de alinhamento do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*®, mostrou resultado com qualidade satisfatória do seqüenciamento e a ausência de possíveis mutações no inserto.

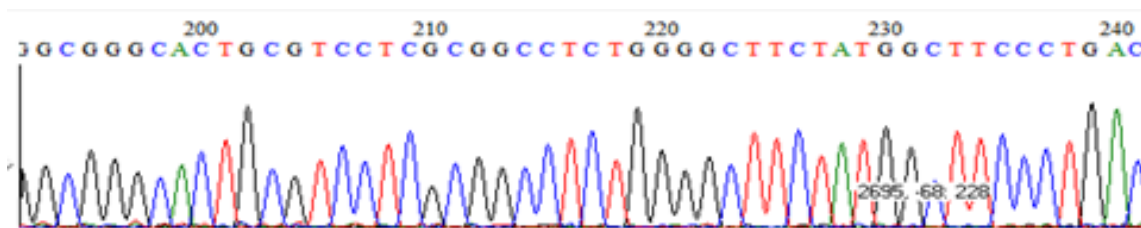


Figura 6: Representação do resultado da reação de seqüenciamento do plasmídeo pIDTSmart com o inserto do cDNA da Hyal-1, variante 8, análise no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*.

### 4.2 Transformação bacteriana, expansão do plasmídeo e restrição enzimática:

Os plasmídeos pUCIDT-smart® foram expandidos para uma quantidade suficiente para prosseguir com a reação de restrição enzimática para obtenção do inserto, totalizando aproximadamente 200µl de plasmídeo, numa concentração de 400ng/µl. A melhor relação de proporção inserto-plasmídeo foi 3:1. A reação de restrição enzimática dos plasmídeos pUCIDT-smart®, com o

inserto, e subclonagem no vetor pET-28a<sup>®</sup>, de acordo com a metodologia descrita em 3.2, gerou os fragmentos apresentados na figura 7, os quais foram extraídos e purificados do gel conforme descrito no mesmo item.

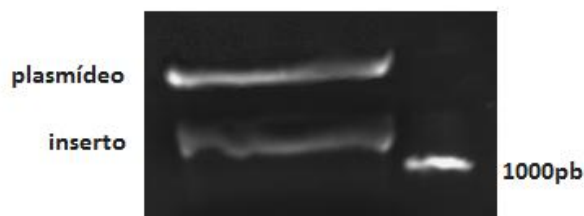


Figura 7: Fotografia do gel de agarose 8% da eletroforese mostrando os fragmentos do plasmídeo pIDTSmart e inserto do gene da Hyal-1 após restrição enzimática com *BamH-1* e *Not-1*.

#### **4.3 Subclonagem nos vetores de expressão e identificação dos clones com a sequência da Hyal-1:**

Os insertos foram, então, subclonados nos vetores de expressão pET-28a<sup>®</sup>, e denominado pET-28-a-Hyal-1. Após a nova transformação bacteriana e a análise dos clones recombinantes, que foram realizadas de acordo com a metodologia descrita em 3.2 e 3.3, obtivemos fragmento com o tamanho de aproximadamente 1300pb identificados em nove clones diferentes em bactérias transformadas com o pET-28-a-Hyal-1, o que indica a presença do inserto. Conforme a figura 8.

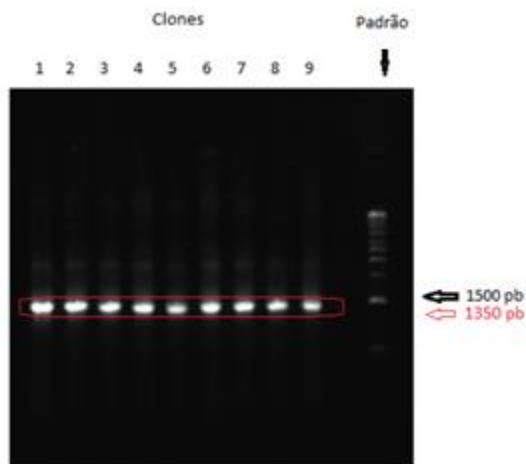


Figura 8: Fotografia do gel de eletroforese em agarose 0,8%, mostrando fragmentos dos produtos da PCR correspondentes ao gene da Hyal-1, variante 8.

A confirmação da clonagem no vetor pET28-a por seqüenciamento foi realizada para certificar a inserção na posição correta nos clones selecionados. Dos cinco clones analisados, todos apresentaram os resultados esperados de seqüenciamento, conforme figura 9. A intensidade dos picos e a comparação com a seqüência padrão, da mesma forma citada no item 4.1, mostrou, novamente, a qualidade do resultado do seqüenciamento e a ausência de possíveis mutações no inserto.

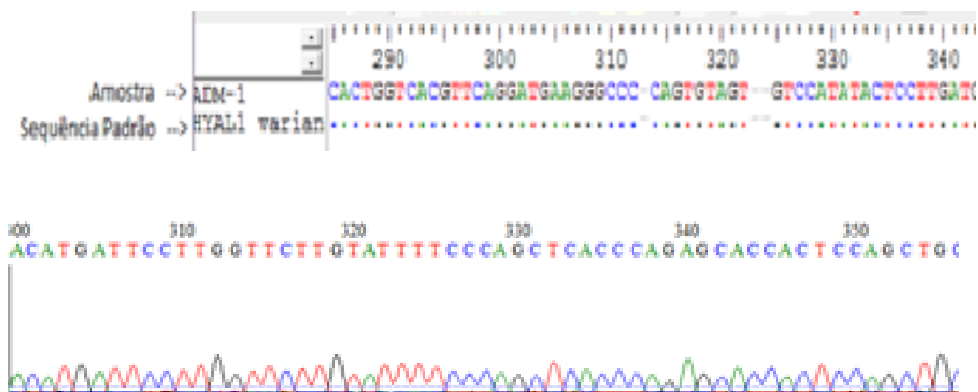


Figura 9: Representação dos resultados da reação de seqüenciamento do plasmídeo pET28-a com o inserto do cDNA da Hyal-1, variante 8, análise no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*.

#### 4.4 Determinação das melhores condições para expressão da Hyal-1:

A expressão foi realizada de acordo com a metodologia descrita, porém a análise em eletroforese em gel 12% SDS-PAGE não mostrou diferença significativa nas amostras que continham o total de 1mL de cultura de bactérias, lisadas por choque térmico, antes e após a indução com IPTG, conforme a figura 10, por isso foi realizado um novo estudo de gradiente de concentração de IPTG e de diminuição de temperatura de indução e aumento do tempo para 8 horas, para testar a expressão desta proteína em taxa metabólica da bactéria menor, e em diferentes concentrações de IPTG.

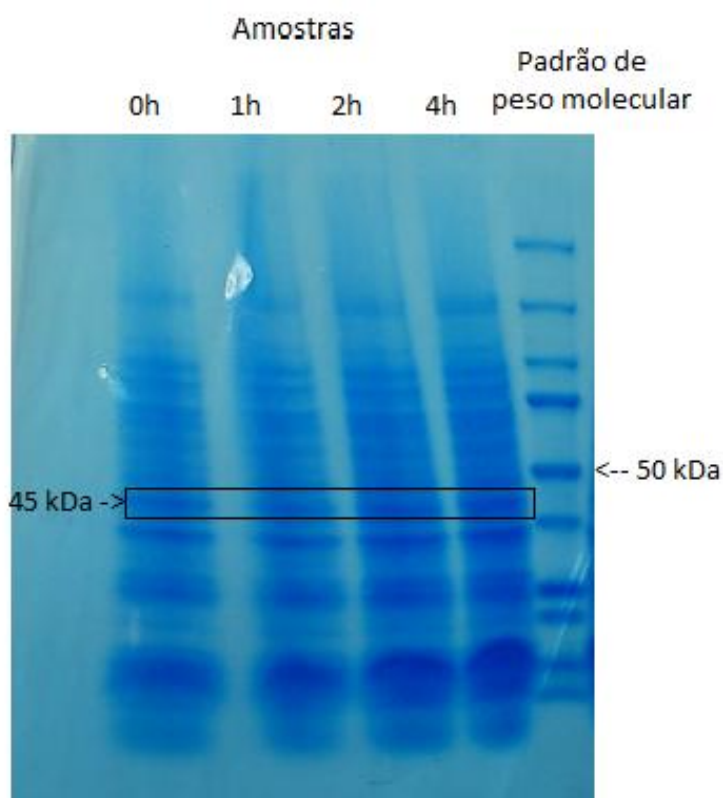


Figura 10: Fotografia da eletroforese em poliacrilamida 12%, destacando as bandas com tamanho de 45 kDa das amostras em tempos 0, 1, 2 e 4 horas após a indução da expressão.



#### 4.5 Confirmação da expressão:

Prosseguimos com o *Western Blotting* para confirmar a detecção da proteína nestes novos testes, já que a eletroforese não foi eficientemente discriminatória. Os clones em que a expressão foi realizada por 8 horas, à 38°C, com uma concentração de 1mM de IPTG, apresentaram os melhores resultados neste experimento. Confirmamos que a indução de expressão à temperatura ambiente e por 8 horas não foi significativa, assim como concentrações inferiores ou superiores à 1mM de IPTG. Conforme apresentado nas figuras 11 e 12, à seguir.

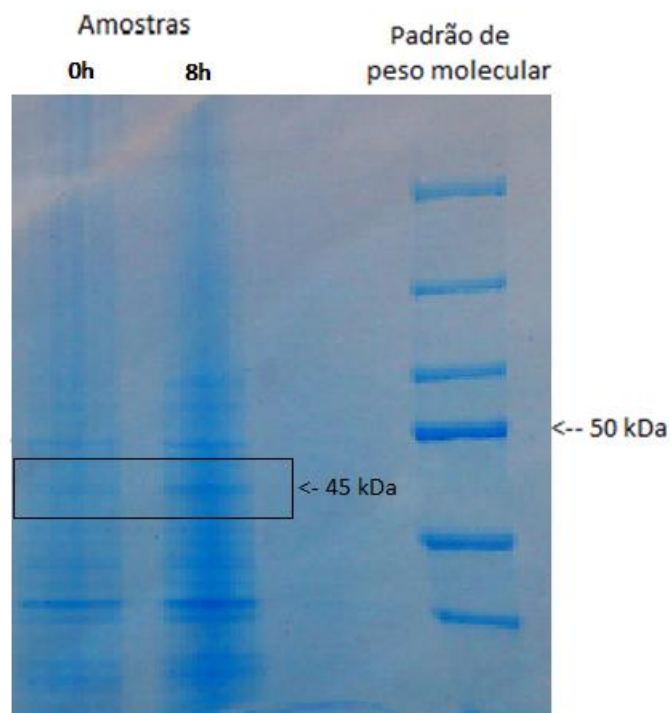


Figura 11: Fotografia do gel de eletroforese em poliacrilamida 12%, em destaque as bandas com tamanho de 45 kDa das amostras em tempos 0 e 8 horas após a indução da expressão, a temperatura ambiente.

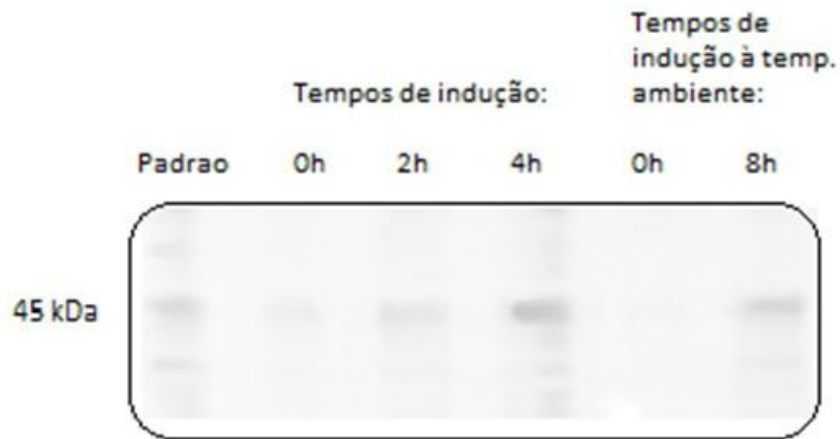


Figura 12: Fotografia da membrana do *Western blotting*, em destaque as bandas com tamanho de 45 kDa das amostras em tempos 0, 2 e 4 horas após a indução da expressão à 38°C e 0 e 8 horas após a indução à temperatura ambiente.

#### 4.6 Purificação da proteína:

Realizamos a purificação das amostras em coluna de níquel-agarose, conforme metodologia item 3.8. E, assim, pudemos confirmar a expressão da Hyal-1 padronizando, assim, suas melhores condições encontradas: Concentração de IPTG de 1mM, temperatura de 38°C, agitação constante 160 rpm por 4 horas, após a indução e obtenção da fração insolúvel, com desnaturação dos corpos de inclusão, conforme figura 13.



Figura 13: Fotografia da membrana do *Western blotting* das amostras antes e depois da lise por ultrassom, respectivamente, em destaque a banda com tamanho de 45 kDa presente apenas na amostra do sedimentado após a lise, que contém a fração insolúvel, com os corpos de inclusão.

Durante a etapa de purificação foram realizadas as lavagens da coluna de níquel-agarose com soluções de uréia em um gradiente de 4, 2, 1, 0,5 e 0M, conforme descrito no item 3.8. para a renaturação da proteína. Portanto, as frações de eluição já contém a proteína na sua forma renaturada.

As frações de eluição, durante o final da purificação, apresentaram o perfil de eletroforese conforme figura 14, e *Westwern blotting* figura 15. Podemos perceber a presença de uma banda com 45kDa na eletroforese da fração de eluição 1, mas no gel de poliacrilamida não foi possível observar nenhuma banda na fração de eluição 2. Porém, no *Western blotting*, que apresenta uma sensibilidade e especificidade maior, já foi possível observar as bandas nas duas frações de eluição.

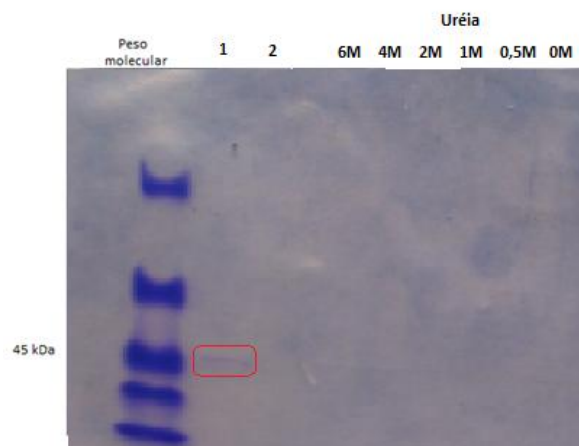


Figura 14: Fotografia do gel de eletroforese em poliacrilamida 12%, em destaque as bandas com tamanho de 45 kDa das amostras das frações de eluição 1 e 2 das amostras e das passagens do gradiente de uréia durante a purificação por cromatografia líquida em coluna de níquel-agarose.

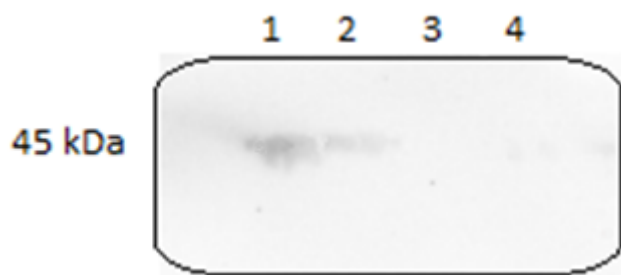


Figura 15: Fotografia da membrana do *Western blotting* das amostras depois da purificação em cromatografia líquida em coluna de níquel-agarose, as amostras 1 e 2 correspondem às frações de eluição, e as amostras 3 e 4 são as frações de lavagem da coluna, mostrando que não ocorreu reconhecimento nenhum nestas amostras. Em destaque as bandas com tamanho de 45 kDa.

As frações eluídas, quantificadas conforme descrito no item 3.8, apresentaram uma concentração média de 100µg/mL, o que determina um rendimento de aproximadamente 25µg/L de cultura.

## **5. DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

A enzima Hialuronidase vem sendo usada amplamente em diversas situações nas últimas décadas, na área médica ou estética (BARING,2011; BRYANT, 1969; LEIBOVITCH, 2006; MOFICOYA, 2010; PEREIRA, 2003) porém, nos últimos anos, seu uso tem crescido progressivamente e com isso diversos casos de reações alérgicas, principalmente ao extrato PH-20, foram reportados (EBERHART, 2004; LEE, 2011; LYALL, 2012; QUHILL, 2004).

Hoje em dia a Hialuronidase PH-20 é comercializada na forma de extrato, obtido de sêmen ou testículos bovinos e tem como principais reações adversas hipersensibilidade ou reações alérgicas, por volta de 6% dos casos (de acordo com a bula fornecida pelo fabricante: Laboratório APSEN). Por estes motivos, os estudos e o desenvolvimento de uma metodologia que permita a produção desta enzima recombinante foi importante, já que o uso de uma isoforma humana e purificada de maneira mais eficiente poderia minimizar os efeitos adversos da administração deste medicamento.

Alguns grupos de pesquisa se dedicaram ao desenvolvimento e melhoramento de rotas de síntese para isoformas de Hialuronidase, proveniente de animais ou humana. Para a produção de Hialuronidase de veneno de abelha em modelos como *Pichia Pastoris* e *Sacharomices Cerevisiae*. Reitinger e colaboradores (2007) obtiveram um rendimento de aproximadamente 1mg/L de cultura inicial, após a otimização (REITINGER, 2007).

Muitos pesquisadores já realizaram diversas tentativas de produzir a Hialuronidase humana recombinante: Em 1997, Frost e colaboradores tentaram

super-expressar a Hyal-1 em cultura de células de linhagem HEK-293, com um rendimento de 0,06ng/L de cultura. Em 2007, Hofinger e colaboradores compararam a atividade da Hyal-1 humana produzida por *E. coli* e *Drosophila*, a última apresentou melhores resultados, porém o rendimento total foi menor, o custo maior e a cauda de histidina estava na porção C-terminal, o que não é a melhor indicação (FROST, 1997; HOFINGER, 2007).

Jung e colaboradores, em 2010, produziram em *N. Benthamiana*, transformadas por *Agrobacterium*, as isoformas 1- 2- 3- e 4-, com um rendimento de 170µg de Hyal-1, e 410µg, 440µg 540µg das isoformas 2- 3- e 4-, respectivamente, para cada 1g de folhas processadas. Neste caso, a atividade da Hyal-1 foi mais de 5 vezes superior a das outras isoformas, embora seu rendimento tenha sido o menor (JUNG, 2010). Diversas isoformas tiveram sua rota de síntese estudada, porém nenhum recombinante obteve liberação da FDA para uso em escala comercial, fora do ambiente de pesquisa.

A Hialuronidase é expressa principalmente em tecidos como fígado, coração e rins, Frost e colaboradores (1997). Então optou-se pela alternativa mais rápida e eficiente que foi a solicitação da síntese química do inserto, pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies ®, Iowa USA), que garante o plasmídeo fornecido com o inserto confirmado por sequenciamento. Esta estratégia também foi utilizada por Jung e colaboradores (2010) e Hofinger e colaboradores (2007), devido à dificuldades encontradas na obtenção do cDNA.

Para subclonagem no vetor de expressão pET-28-a, os sítios de restrição para as enzimas *Bam-HI* e *Not-I*, nas porções 5' e 3', respectivamente, foram

escolhidos por estarem presentes no sítio de múltipla clonagem neste plasmídeo e, além disso, não foram encontrados em nenhuma outra região do inserto, conforme descrito no item 3.1.

As enzimas escolhidas permitem a “dupla digestão”, em uma reação de restrição enzimática simultânea, pois utilizam o mesmo tampão. A possibilidade de utilizar esta estratégia foi confirmada, conforme descrito também no item 3.1, já que esta reação apresenta uma eficiência próxima a 100% de acordo com a orientação do fabricante (New England BioLabs Inc., Beverly, MA, EUA).

Uma das vantagens que motivou a escolha do plasmídeo pET-28-a foi a presença da cauda de poli-histidina como método de purificação e a possibilidade de escolha se a mesma pode ser inserida na porção carboxiterminal (C-terminal) ou aminoterminal (N-terminal), ou as duas simultaneamente. De acordo com Zhang e colaboradores (2009) a porção C-Terminal da Hyal-1 tem importante influência na sua atividade (ZHANG, 2009).

Assim, a poli-histidina foi, então, inserida na porção N-terminal, pois se acredita que esta porção exerça a menor influência possível no sítio ativo desta enzima. Este plasmídeo ainda nos oferece a opção de retirada da cauda de histidina, pois existe um sítio de clivagem para trombina nesta porção caso acreditemos que ela esteja influenciando na atividade enzimática, já na opção de inserção da cauda de histidina na porção C-terminal isto não é possível neste plasmídeo.

O gene *Hyal-1*, variante 8, possui uma relação de 14/435 códons (menos de 3% do total) com frequência de expressão menor que 0,1; e destes menos de 1% com frequência menor que 0,5 (*E. coli* Usage Analyser 2.1 ©, M. Morris),



como não se encontrou uma percentagem elevada destes códons e, além disto, temos o interesse de subclonar, futuramente, este inserto para produção em outros organismos, leveduras, microalgas ou protozoários, neste caso, as modificações para otimização de códons não seriam uma estratégia tão interessante para elevar o rendimento.

Outra vantagem na utilização deste método é a facilidade na purificação, já que a cromatografia líquida em coluna de níquel-agarose, por afinidade, se mostrou muito eficiente e rápida na purificação desta proteína. A última vantagem na escolha deste plasmídeo foi à possibilidade de detecção da cauda de histidina por anticorpos específicos (manual kit HisProbe-HRP Thermo Scientific, USA).

Desta forma, foi possível a confirmação da expressão da proteína e a detecção da fração purificada em que ela se encontrava, e com isso ainda pudemos detectar que ela foi produzida em corpos de inclusão, conforme esperado, já que na literatura esta característica em todos os recombinantes produzidos (HOFINGER, 2007; SOLDATOVA, 1998).

Com isso pudemos prosseguir com a metodologia específica descrita para a obtenção da proteína purificada, com a desnaturação dos corpos de inclusão e renaturação da proteína durante a passagem de gradientes de soluções cada vez menos concentradas com uréia, pela cromatografia em coluna de níquel, conforme descrito na metodologia em 3.8. Estes resultados apresentaram uma taxa de perda pequena, já que recuperamos a maior quantidade de proteína durante a primeira eluição, pois não foi observada presença de bandas nas frações de passagem de tampão de renaturação no gel de eletroforese e nem

no *Western blotting*, que é um método mais sensível, conforme mostrado na figura 14.

A Hyal-1 apresenta bons resultados para renaturação quando produzida em corpos de inclusão por *E.coli*, e renaturada por gradiente de uréia. Conforme descrito por Bhuyan, 2002, o uso de hidrocloreto de guanidina nesta etapa provoca a forte formação de agregados por esta enzima, mesmo esta sendo a única variante solúvel em plasma (LIN, 1994; PRIMAKOFF, 1984; REITINGER, 2008).

Produzimos um total de 4 litros de cultura de bactérias para uma primeira tentativa de purificação, o que rendeu aproximadamente 100µg de proteína pura, ou seja, um rendimento de 25µg/L de cultura inicial.

Os custos da produção de proteínas a partir desta tecnologia não são elevados assim como o tempo para a produção é o mais rápido, aproximadamente 3 dias entre expressão e purificação, ao se comparar com modelos em plantas, fungos, células animais ou purificação de extrato, por volta de uma semana (FROST, 1997; HOFINGER, 2007; JUNG, 2010). Os laboratórios Bioclone Inc. comercializam 100µg da Hyal-1 humana recombinante, produzida por *E. coli*, por aproximadamente \$1600,00 (dólares americanos), mas não especificam qual variante produzida nem a atividade enzimática confirmada (Bioclone Inc®), e também não possuem licença da FDA para uso em aplicações fora do âmbito da pesquisa básica.

Com este valor de mercado aproximadamente calculamos que, com a produção de 8L de cultura, teoricamente, poderíamos recuperar o investimento realizado no desenvolvimento deste projeto. Isso significa que, a partir do

momento que confirmamos a expressão e o rendimento, parece promissor o investimento no melhoramento desta síntese, como o aumento na escala e produção em biorreatores que permitam um maior e mais vantajoso rendimento na produção.

## **6. CONCLUSÃO**

## 6.CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa nos permitem concluir que:

A região que flanqueia a *Hyal-1*, variante 8, produzida pela síntese química foi viabilizada no presente estudo.

A subclonagem, sítio dirigida, no plasmídeo de expressão pET-28-a-Hyal-1 adicionada à cauda de poli-histidina se mostrou uma boa estratégia para purificação da proteína recombinante Hyal-1.

Expressão da Hyal-1 em *Escherichia coli* pode ser confirmada somente por *Western blotting*. A purificação em quantidade maior da proteína recombinante utilizando coluna de níquel-agarose pode ser confirmada por eletroforese em poliacrilamida 12%.

O rendimento correspondente a 25 µg por litro de cultura inicial sugere viabilidade de produção para futuros investimentos.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

An S, Chen L, Wei JF, Yang X, Ma D, Xu X, Xu X, He S, Lu J, Lai R. **Purification and Characterization of Two New Allergens from the Venom of *Vespa magnifica***. PLoS One;7(2):e31920. Epub 2012 Feb 27, 2012.

APSEN, Bula Hyalozima; [http://www.apsen.com.br/novosite/bulas\\_pdf](http://www.apsen.com.br/novosite/bulas_pdf), consultado em 26 de maio de 2013.

Arhens P B, **Enhancement of phorbol ester induced cell aggregation after alterations in asparagine-linked oligossacharides**. Bio Cell 77: 255-260, 1993.

Baring DE, Marshall JN. **How we do it - Hyaluronidase injection for the rhinoplasty patient**. Clin Otolaryngol. Dec;36(6):588-9, 2011.

Bioclone inc. <http://bioclone.us/>, visitado em 20 de agosto de 2013.

Bhuyan A K. **Protein stabilization with urea and guanidin**. Biochemistry, 41 ( 45 ): 13.386 - 13.394; 2002.

Birch M, S. Mitchell, IR Hart, **Isolation and characterization of human melanoma cell variants expressing high and low levels of CD44** , Cancer Res. 51: 6660-6667, 1991.

Bland J H, Cooper S M; **Osteoarthritis: a review of the cell biology involved and evidence for reversibility. Management rationally related to known Genesis and pathophysiology**. Semin Arthritis Rheum 14:106-133, 1984.

Bryant JA **Local and topical anesthetics in ophthalmology.** Surv Ophthalmol 13:263–283; 1969.

Candeias, J. A. N. **A Engenharia Genética.** Rev. Saúde Pública. São Paulo, vol. 25, n. 1, Fev. 1991.

Cheng G, Swaidani S, Sharma M, Lauer ME, Hascall VC, Aronica MA. **Hyaluronan deposition and correlation with inflammation in a murine ovalbumin model of asthma.** Matrix Biol., 30(2):126-34, 2011.

Chole RH, Gondivkar SM, Gadbail AR, Balsaraf S, Chaudhary S, Dhore SV, Ghonmode S, Balwani S, Mankar M, Tiwari M, Parikh RV. **Review of drug treatment of oral submucous fibrosis.** Oral Oncol. Dec 27, 2011.

Csoka A B, G.I. Frost, R. Stern, **The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes,** Matrix Biol. 20, 499–508, 2001.

Dieleman M, Bettink-Remeijer MW, Jansen J, Hoppenreijns VP, van der Pol R, Baarsma S, van Dijk K, de Waard-van der Spek FB, van Wijk RG, Zijlmans BL. **High incidence of adverse reactions to locoregional anaesthesia containing hyaluronidase after uneventful ophthalmic surgery.** Acta Ophthalmol. doi: 10.1111/j.1755-3768.2011.02377.x, 2012.

Eberhart AH, Weiler CR, Erie JC **Angioedema related to the use of hyaluronidase in cataract surgery.** Am J Ophthalmol 138:142–143; 2004.

El-mezayen HA, Toson el-SA, ShihaGE. **Role of hyaluronic acid, its degrading enzymes, degradation products, and ferritin in the assessment of fibrosis stage in Egyptian patients with chronic hepatitis C.** Eur J Gastroenterol Hepatol. Jan;25(1):69-76, 2013.



Engstrom Laurent A, **Hyaluronan in joint disease**. J Intern Med 242: 57-60, 1998.

Evanko SP, Potter-Perigo S, Bollyky PL, Nepom GT, Wight TN. **Hyaluronan and versican in the control of human T-lymphocyte adhesion and migration**. Matrix Biol. Mar;31(2):90-100, 2012.

Farr C, Menzel J, Seeberger J, Schweigle B. **Clinical pharmacology and possible application of hyaluronidase with reference to Hylase "Dessau"** . Wien Med Wochenschr. 147(15):347-355, 1997.

Fechner P U, W Wiechmann, **Intraocular use of Hyaluronidase to dissolve sodium hyaluronic acid**.J RefratSurg 13: 508-513, 1997.

Fischer-Szafarz B, **Hyaluronidase polymorphism detected by polyacrilamide gel electrophoresis application to hyaluronidases from bacteria, slime molds, bee and snake venoms, bovine testes, rat liver lysosomes and human serum**. Analytical Biochem. 143:76-81, 1984.

Frost GI, Csoka TB, Wong T, Stern R. **Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase**. Biochem Biophys Res Commun. 236(1):10–15, 1997.

Ghali A M. **The efficacy of 0.75% levobupivacaine versus 0.75% ropivacaine for peribulbar anesthesia in vitreoretinal surgery**.Saudi J Anaesth. Jan;6(1):22-6, 2012.

Gmach I M, Kreil G **Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm**. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 90: 3569–3573, 2003.

**Halozyme Therapeutics and Baxter Healthcare Corporation  
Announce FDA Approval of Hylenex, 2008.**

Hofinger E S, Spickenreither M, Oschmann J, Bernhardt G, Rudolph R, Buschauer A. **Recombinant human hyaluronidase Hyal-1: insect cells versus Escherichia coli as expression system and identification of low molecular weight inhibitors.** *Glycobiology.* Apr;17(4):444-53; 2007.

Hompesch M, Muchmore DB, Morrow L, Ludington E, Vaughn DE **Improved postprandial glycemic control in patients with type 2 diabetes from subcutaneous injection of insulin lispro with hyaluronidase.** *Diabetes Technol Ther.* Mar;14(3):218-24, 2012.

Hubbard C, McNamara JT, Azumaya C, Patel MS, Zimmer J. **The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan.** *J Mol Biol.* Apr 20;418(1-2):21-31, 2012.

Hubbart W C, M Johnson, H Gong, B T Gabelt, J A Peterson, R Sawhney, T Freddo, P L Kaufman. **Intraocular pressure and outflow facility are unchanged following acute and chronic intracameral chondroitinase ABC and hyaluronidase in monkeys.** *Exp. Eye Res* 665: 177-190, 1997.

Hyman, L. J., Friedman, B. A., Friedlander, S. O. **Serum inhibition of hyaluronidase following surgical procedures for cancer and nonmalignant disease.** *Surg. Gyn. Obstet.* 100, 515-520, 1955.

Hynes WL, Walton SL **Hyaluronidases of Gram-positive bacteria.** *FEMS Microbiol.Lett.*183: 201–207, 2000.

James A. **Airway remodeling in Asthma**. *Curr Opin Pulm Med*. 11: 1-6, 2005.

Jung Yushul, Man-Yong Jung, Jin-Hee Park, GyouChul Jung, Young Seon Hong, Chang Hwan Yeom, Sukchan Lee, **Production of human hyaluronidase in a plant-derived protein expression system: Plant-based transient production of active human hyaluronidase**. *Protein Expression and Purification* 74 181–188, 2010.

Junqueira L C U, Carneiro J; **Biologia Celular e Molecular**. 8 edição, editor Guanabara Koohan, 2008.

Kolarova, M., **Host-tumor relationship XXXIII Inhibitor of hyaluronidase in blood serum of cancer patients**. *Neoplasma* 22, 435-439, 1975.

Lee H K, Choi E J, Lee P B, Nahm F S. **Anaphylactic shock caused by the epidurally-administered hyaluronidase**. *Korean J Pain*. 2011 Dec;24(4):221-5. Nov 30, 2011.

Lehninger, A. L. **Princípios de Bioquímica**. 5ed. São Paulo: Sarvier, 2011.

Leibovitch I, Tamblyn D, Casson R, Selva D. **Allergic reaction to hyaluronidase: a rare cause of orbital inflammation after cataract surgery**. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 244;944-949; 2006.

Lima, B. D. **A produção de insulina humana por Engenharia Genética**. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 23, Nov./Dez. 2001.

Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W. F., Myles, D. G., and Primakoff, P. *J. Cell. Biol.* 125, 1157–63, 1994.

Ling Zhang, Alamelu G. Bharadwaj, Andrew Casper, Joel Barkley, Joseph J. Barycki, and Melanie A. Simpson, **Hyaluronidase Activity of Human Hyal1 Requires Active Site Acidic and Tyrosine Residues S**, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 284, NO. 14, pp. 9433–9442, 2009.

Lokeshwar, **Epigenetic Regulation of HYAL-1 Hyaluronidase Expression - Identification of Hyal-1 promoter**. The Journal of Biological Chemistry Vol. 283, NO. 43, pp. 29215–29227, 2008.

Lyall DA, McQueen M, Ramaesh K, Weir C. **A sting in the tale: cross reaction hypersensitivity to hyaluronidase**. *Eye (Lond)*. Nov;26(11):1490, 2012.

Mace SE, Harb G, Friend K, Turpin R, Armstrong EP, Lebel F. **Cost-effectiveness of recombinant human hyaluronidase - facilitated subcutaneous versus intravenous rehydration in children with mild to moderate dehydration**. *Am J Emerg Med*. Jun;31(6):928-34, 2013.

McGinty J B; *Opetative arthroscopy*. Lippincott- Raven, Second Edition: 109, 1996.

Meyer K, Linker A Davdson E A, Weissman **The muccopolissacharides of bovine cornea**; *J Biol Chem* 205-2 – 611-616, 1953.

Mio, K., Stern, R. **Inhibitors of the hyaluronidases**. *Matrix Biology* 21, 31-37, 2002.

Modena T, B Conti, I Genta, F Pauanetto, M E Tira, A Gazzaniga. **Hyaluronidase-injectable microparticles intended for the treatment of extravasation.** J Microencapsulation 15: 85-92, 1998.

Mofikoya BO, Adeyemo WL, Ugburo AO. NigerPostgradMedJ. **An overview of biological basis of pathologic scarring.** Mar;19(1):40-5, 2012.

Nagy N, Freudenberg T, Melchior-Becker A, Rock K, TerBraak M, Jastraw H, Kinzig M, Lucke S, Suvorava T, Kojda G, Weber A A, Sorgel F, Levkav B, Ergun S and Fischer J W. **Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights of hyaluronan synthesis.** Circulation 122: 2313-2322, 2010.

NCBI gene ID3373, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, consultado em 13 de janeiro de 2013.

Nobel Prize: site oficial dos organizadores do Prêmio Nobel, <http://www.nobelprize.org>, visitado em julho de 2013.

Pereira, José Roberto da costa, et al., **Patologic scars treatment with the cepalin, allantoin and heparin association** RBM, 60 (2)603-08, 2003.

Preston M, Gong X, Su W, Matsumoto SG, Banine F, Winkler C, Foster S, Xing R, Struve J, Dean J, Baggenstoss B, Weigel PH, Montine TJ, Back SA, Sherman LS. **Digestion products of the PH20 hyaluronidase inhibit remyelination.** Ann Neurol. Feb;73(2):266-80, 2013.

Primakoff, P., Hyatt, H., and Myles, D. G. *J. Purification and characterisation of hyaluronidase from the venom of honey bee, Apismellifera*, Eur. J. Biochem.139, 217–223, 1984.

Quhill F, Bowling B, Packard RB **Hyaluronidase allergy after peribulbar anesthesia with orbital inflammation.** J Cataract Refract Surg 30:916–917; 2004.

Reitinger S, Thorsten Boroviak, Gerhard Thomas Laschober, Christine Fehrer, Johannes Mullegger, Herbert Lindner, Gu"nterLepperdinger, **High-yield recombinant expression of the extremophile enzyme, bee hyaluronidase in Pichiapastoris.** Protein Expression and Purification 57, 226–233, 2008.

Rempel LA, Freking BA, Miles JR, Nonneman DJ, Rohrer GA, Schneider JF, Vallet JL. **Association of porcine heparanase and hyaluronidase 1 and 2 with reproductive and production traits in a landrace-duroc-yorkshire population.**Front Genet. 2:20. Epub 2011 May 4, 2011.

Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, Omar AR, Mohit M, Janzamin E,Samani FS, Torshizi Z, Nematollahi-Mahani SN. **Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly.**In Vitro Cell DevBiol Anim. Feb;48(2):75-83. doi: 10.1007/s11626-011-9480-x. Epub 2012 Jan 25, 2012.

Soldatova L. N., R. Cramer, M. Gmachl, D.M. Kemeny, M.Schmidt, M. Weber, U.R. Mueller, **Superior biologic activity of therecombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with Escherichia coli,** J. Allergy Clin. Immunol. 101 (1998) 691–698.

Stevens JW. **Swarm Chondrosarcoma: A Continued Resource for Chondroblastic-Like Extracellular Matrix and Chondrosarcoma Biology Research.** Connect Tissue Res.Jun 12. 2013.

Takano H, Furuta K, Yamashita K, Sakanaka M, Itano N, Gohda E, Nakayama K, Kimata K, Sugimoto Y, Ichikawa A, Tanaka S. **Restriction of Mast Cell Proliferation through Hyaluronan Synthesis by Co-cultured Fibroblasts.** *Biol Pharm Bull.* 35(3):408-12, 2012.

Termeer C C, Hennies J, Voith U, Ahrens T, Weis J M, Prehm P and Simon J C. **Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells.** *J Immunol* 165: 1863-1870, 2000.

Thermo Scientific kit HisProbe-HRP manual: <http://www.piercenet.com>, consultado em 20 de maio de 2013.

Triggs-Raine, B., Salo, T. J., Zhang, H., Wicklow, B. A., and Natowicz, M. *R. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6296–6300, 1999.

Turner D C, Flier L A, Carbonetto S; **Identification of a cell surface protein involved in PC-12 cell-substratum adhesion and neurite outgrowth on laminin and collagen.** *J Neurosci.* 9:3287-3296; 1989.

Vaughn DE, Muchmore DB. **Use of recombinant human hyaluronidase to accelerate rapid insulin analogue absorption: experience with subcutaneous injection and continuous infusion.** *EndocrPract.* Nov-Dec;17(6):914-21,2011.

Villas-Boas IM, Gonçalves-de-Andrade RM, Pidde-Queiroz G, Assaf SL, Portaro FC, Sant'anna OA, van den Berg CW, Tambourgi DV. **Premolissemirufa (Walker, 1856) Envenomation, Disease Affecting Rubber Tappers of the Amazon: Searching for Caterpillar-Bristles Toxic Components.** *PLoS Negl Trop Dis.* Feb;6(2):e1531. Epub 2012.

Violette A, Leonardi A, Piquemal D, Terrat Y, Biass D, Dutertre S, Noguier F, Ducancel F, Stöcklin R, Križaj I, Favreau P. **Recruitment of glycosyl hydrolase proteins in a cone snail venomous arsenal: further insights into biomolecular features of conus venoms.** Feb;10(2):258-80, 2012.

Wohlrab J, Finke R, Franke WG, Wohlrab A. **Clinical trial for safety evaluation of hyaluronidase as diffusion enhancing adjuvant for infiltration analgesia of skin with lidocaine.** Dermatol Surg. Jan;38(1):91-6, 2012.

Wu SC, Chen CH, Chang JK, Fu YC, Wang CK, Eswaramoorthy R, Lin YS, Wang YH, Lin SY, Wang GJ, Ho ML. **Hyaluronan initiates chondrogenesis mainly via CD44 in human adipose-derived stem cells.** J Appl Physiol Jun;114(11):1610-8, 2013.

Zhang H, Martin-DeLeon PA. **Mouse epididymal Spam1 (PH-20) is released *in vivo* and *in vitro*, and Spam1 is differentially regulated in testis and epididymis.** Biol. Reprod.65:1586–1593, 2001.