

Marina Katia Ferreira Mazzone

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

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

MAZZONI, M. K. F. **Clonagem e expressão de proteína antiapoptótica presente na hemolinfa de *Lonomia obliqua* Walker 1855 (Lepidoptera: Saturniidae) em *Escherichia coli***. 2015. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

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

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

ABSTRACT

MAZZONI, M. K. F. **Cloning and expression of antiapoptotic protein present in the hemolymph of *Lonomia obliqua* Walker 1855 (Lepidoptera: Saturniidae) in *Escherichia coli*.** 2015. 82 p. Master thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

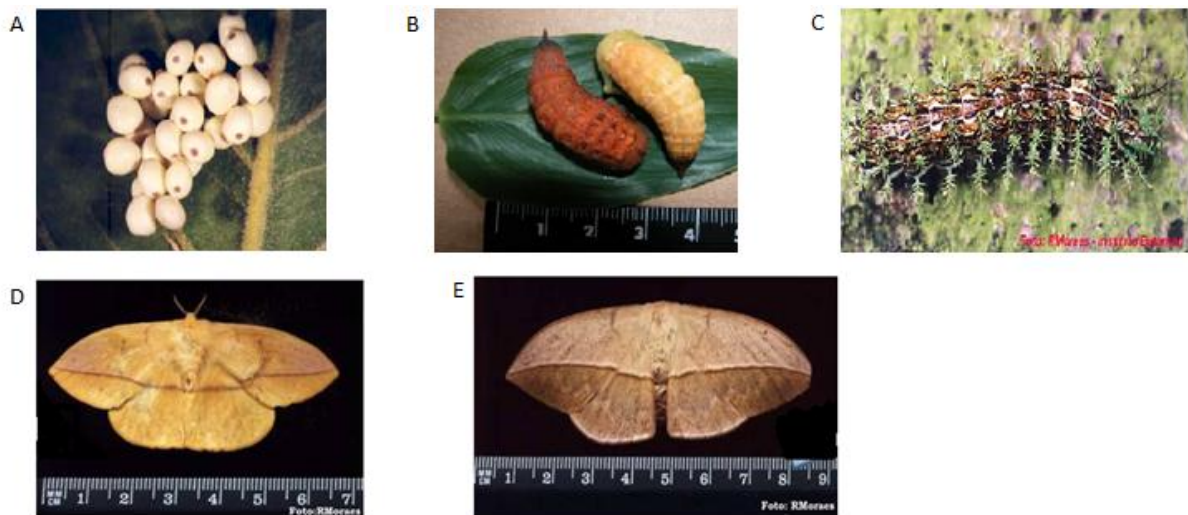


Figura 1 - Ciclo completo da metamorfose de *L. obliqua*

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

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

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

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



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

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

Fonte: Adaptado de CARMO, 2012.

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

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

1.2 A hemolinfa de insetos e a indústria farmacêutica

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

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

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

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

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

1.3.1 Hemolinfa

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

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

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

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

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

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

1.5 A morte celular e suas características

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

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

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

1.5.1 Apoptose

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

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

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

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

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

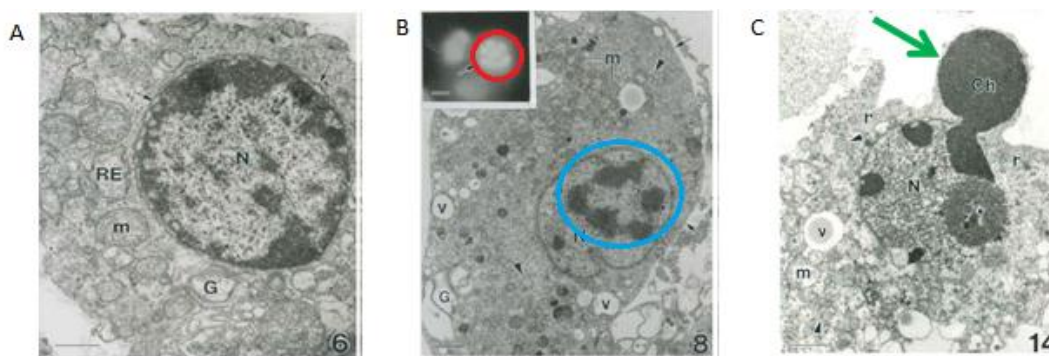


Figura 3 - Processo evolutivo da morte celular por apoptose em célula VERO

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

Fonte: Modificada de Mendonça et al., 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5.2 Necrose

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

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

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

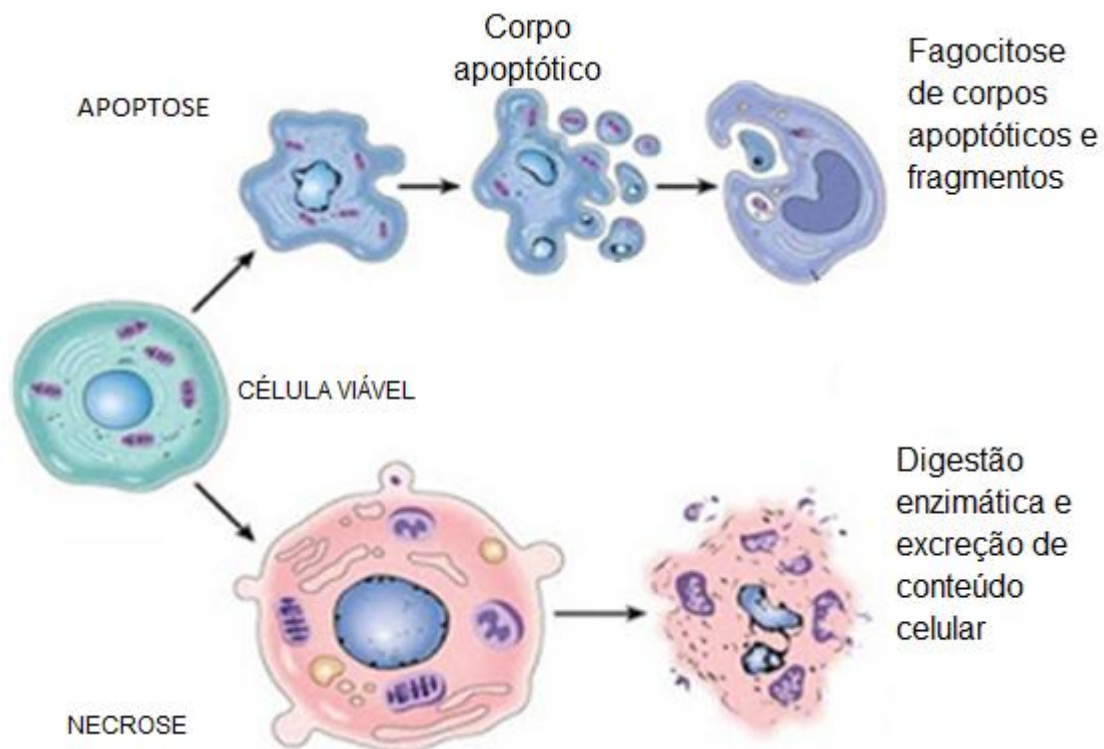


Figura 4 - Diferenças entre morte celular por apoptose e por necrose.

Diferença dos acontecimentos na morte por apoptose e na necrose.

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

1.6 O sistema de expressão de proteínas recombinantes

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

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

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

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

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

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

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

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

^a - Padrões de glicosilação diferentes de células de mamíferos

Fonte: Modificado de Cha et al., 2005.

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

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

no periplasma ou utilizar um sistema de secreção, ou ocorrer intracelularmente, gerando um produto solúvel ou insolúvel sob a forma de corpúsculo de inclusão, dificultando a incorporação dos aminoácidos subsequentes e representando obstáculos para a expressão de genes heterólogos (Tabela2). Portanto, uma das principais considerações na produção de uma proteína recombinante em *E. coli*, é a estratégia de produção (BANEYX, 1999; JONASSON et al., 2002).

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

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

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

Fonte: Modificado de JONASSON et al., 2002.

1.7 Importâncias da obtenção desta proteína em maior quantidade

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

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

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

CONCLUSÃO

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

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS*

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

* De acordo com:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **GenBank**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 20 abr. 2014.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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