

**Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação Lato Sensu
Especialização em Toxinas de interesse da saúde**

Fernanda Vega Costenaro

**Otimização da expressão e purificação de proteína recombinante
imunossupressora**

São Paulo

2024

Fernanda Vega Costenaro

**Otimização da expressão e purificação de proteína recombinante
imunossupressora**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Toxinas de interesse da saúde do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Toxinas de interesse da saúde.

Orientadora: Dra. Giselle Pidde Marques Porto

São Paulo

2024

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Costenaro , Fernanda Vega

Otimização da expressão e purificação de proteína recombinante
imunossupressora / Fernanda Vega Costenaro ; orientador(a) Dra. Giselle Pidde
Marques Porto - São Paulo, 2024.

30 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan,
Especialização na Área da Saúde - .

Versão corrigida final

1. Proteína Recombinante 2. Expressão . 3. Purificação. 4. Imunobiológico I. Porto,
Dra. Giselle Pidde Marques . II. Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde
- . IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Fernanda Vega Costenaro, aluno(a) do Curso de Especialização em Toxinas de interesse da saúde, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
() 06 meses
() 12 meses
() Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 10 de Janeiro de 2024

Fernanda Vega Costenaro
.....
aluno(a)

De acordo:
Orientador(a): *Giselle P. P. Costa*

Dra. Giselle Piddé
Especialista de Laboratório
Laboratório de Imunoquímica
Fundação Butantan

Para Deus.

Para meu mentor espiritual.

Para meus pais Marisa e Renato, por sempre acreditarem nas minhas escolhas e darem forças para seguir firme em meu caminho.

Para meu namorado Airton, em sempre me animar a seguir meu caminho.

Para minhas amigas Ana Julia e Pamela, por me ouvirem e estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

Para meus cachorros, Conhaque, Batata e Pandora por estar sempre dispostos a me acalmar.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Giselle Pidde por todo o apoio, ensinamentos, paciência e principalmente pela oportunidade de me receber em seu laboratório de portas abertas.

A Dra. Carla Baptistão por doar um pouco do seu tempo me ensinando e apoio.

A todos do laboratório de imunquímica por estar sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos e professores do Instituto Butantan, no qual tive grandes experiências. Em especial aos amigos de toxinas, Mariana, Yasmin, Naiara, Daniele e Enzo, pelas risadas e conversas tornando os dias mais leves.

A Heloisa especialmente por estar todos os dias ao meu lado e pude sempre contar com sua ajuda e palavras, uma super companheira.

Obrigada a todos!!!

“Se você voltar, não será mais o mesmo.”

RESUMO

COSTENARO, Fernanda Vega. **Otimização da expressão e purificação de proteína recombinante imunossupressora**. 2024. 30p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Toxinas de interesse da saúde) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2024.

A descoberta das drogas imunossupressoras na década de 60 possibilitou imenso avanço na medicina, sendo utilizado, por exemplo, em pacientes transplantados, com a finalidade de tratamento e/ou prevenção da rejeição de enxertos. Os estudos na área continuam crescendo e evoluindo, em busca de atualizações do arsenal terapêutico mais direcionado e específico. No Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, uma proteína no veneno da serpente *Lachesis muta* foi isolada e identificada com propriedades imunossupressoras, nomeada LMVp. O uso da tecnologia de DNA recombinante permitiu avanços na síntese de imunobiológicos, sendo crucial para pesquisas sobre estrutura, função e produção de medicamentos terapêuticos. Com o objetivo de alcançar um desempenho mais efetivo na obtenção da LMVp, este trabalho utilizou as bactérias competentes da linhagem BL21 DE3 STAR PLYSS na tentativa de alcançar uma otimização dos processos de expressão, purificação e concentração da proteína recombinante. Entretanto, este caminho de otimização não se mostrou eficiente, demonstrando que se deve seguir outras estratégias para se obter melhor rendimento da LMVp.

Palavras-chave: Proteína recombinante. Expressão. Purificação. Imunobiológico.

ABSTRACT

COSTENARO, Fernanda Vega. **Optimization of expression and purification of recombinant immunosuppressive protein**. 2024. 30p. Course Completion Work (Specialization in Toxins of Health Interest) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2024.

The discovery of immunosuppressive drugs in the 1960s enabled immense advances in medicine, being used, for example, in transplant patients, with the purpose of treating and/or preventing graft rejection. Studies in the area continue to grow and evolve, in search of updates to the more targeted and specific therapeutic arsenal. At the Immunochemistry Laboratory of the Butantan Institute, a protein in the venom of the *Lachesis muta* snake was isolated and identified with immunosuppressive properties, named LMVp. The use of recombinant DNA technology has allowed advances in the synthesis of immunobiologicals, being crucial for research into the structure, function and production of therapeutic medicines. With the aim of achieving more effective performance in obtaining LMVp, this work used competent bacteria from the BL21 DE3 STAR PLYSS strain in an attempt to achieve optimization of the expression, purification and concentration processes of the recombinant protein. However, this optimization path did not prove to be efficient, demonstrating that other strategies must be followed to obtain better LMVp performance.

Keywords: Recombinant protein. Expression. Purification. Immunobiological.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Análise de expressão da proteína recombinante LMVp.	22
Figura 2: Análise da expressão por Western Blot.	23
Figura 3: Análise de solubilidade	24
Figura 4: Cromatografia da purificação.	24
Figura 5: SDS-PAGE corado por prata.	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

RPM - Rotação por minuto

D.O. - Densidade Óptica

IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

SDS - Dodecil- sulfato de sódio

LB - Luria Bertani

PBS - Phosphate buffered saline (Tampão salina tamponada com fosfato)

BSA - Bovine serum albumin (albumina de soro bovino)

IgG - Imunoglobulina G

PM – Peso molecular

Sumário	
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Imunidade	13
1.2 Imunossupressão	14
1.3 <i>Lachesis muta</i>	15
1.4 Proteína imunossupressora isolada de <i>L. muta</i>	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 Geral	17
2.2 Específico	17
3 METODOLOGIA	18
3.1 Lista de Reagentes e Soluções	18
3.2 Clone codificante para LMVp	18
3.3 Expressão da proteína recombinante	18
3.3.1 Transformação	18
3.3.2 Indução de expressão	19
3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	19
3.5 Western Blot	200
3.6 Sonicação	20
3.7 Purificação	21
4 RESULTADOS	22
4.1 Expressão	22
4.2 Sonicação	23
4.3 Purificação	24
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

1.1 Imunidade

O corpo humano é protegido de agentes infecciosos e de diversos danos, por uma variedade de células e moléculas, que juntas constituem o sistema imunológico (MURPHY, 2014). As respostas desenvolvidas contra infecções por patógenos potenciais e outros tipos de lesões são conhecidas como respostas imunes. O sistema imunológico inato sendo a primeira linha de defesa desempenha o papel inicial na proteção do organismo contra invasões de patógenos, bem como reparos de danos físicos e químicos, atuando no balanço fisiológico (HALLER; KOCHS; WEBER, 2006). A imunidade adaptativa constitui a segunda barreira de defesa do nosso organismo, capaz de elaborar uma reação especializada contra o alvo, além de estimular a formação da memória imunológica, essencial para aumentar o refinamento e velocidade da resposta em contato posterior ao mesmo estímulo (NETEA; QUINTIN; VAN DER MEER, 2011).

A imunidade humoral refere-se à resposta imunológica mediada por anticorpos quando um antígeno está presente. Os anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas (Ig), são glicoproteínas sintetizadas pelos linfócitos B e consistem em duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. Tanto as cadeias leves quanto as pesadas apresentam regiões variáveis, que desempenham um papel crucial no reconhecimento do antígeno, e regiões constantes, responsáveis pela função efetora (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Os linfócitos B desempenham um papel crucial na resposta imune específica do organismo, atuando no âmbito da imunidade humoral. Essas células possuem receptores de membrana específicos para epítopos antigênicos particulares. Ao detectar o antígeno correspondente, os linfócitos B são ativados, levando à sua multiplicação e à formação de plasmócitos e células B de memória. Esses linfócitos respondem aos antígenos, gerando quantidades significativas de anticorpos, os quais têm a capacidade de reconhecer, neutralizar, opsonizar, lisar e/ou ativar outras moléculas e células (MOREIRA, 2014).

Os anticorpos, proteínas circulantes, são gerados pelos vertebrados como resposta à exposição a estruturas estranhas denominadas antígenos. Notavelmente

diversificados, esses anticorpos exibem especificidade em sua capacidade de reconhecer estruturas moleculares distintas, desempenhando o papel crucial de mediadores na imunidade humoral contra diversas classes de microrganismos. (MOREIRA, 2014).

1.2 Imunossupressão

A imunossupressão é à ação deliberada de reduzir a atividade ou eficácia do sistema imunológico. Geralmente, essa prática é adotada para prevenir a rejeição em transplantes de órgãos ou para o tratamento de doenças autoimunes, tais como lúpus, artrite reumatoide, esclerose sistêmica e doença inflamatória intestinal, entre outras. O método comum para alcançar a imunossupressão é o uso de medicamentos, embora também sejam empregados outros meios, como plasmaferese ou radiação. Com o sistema imunológico praticamente desativado, a pessoa imunossuprimida torna-se suscetível a infecções oportunistas(REZENDE, 2011).

A administração de agentes imunossupressores é essencial para evitar a rejeição de órgãos transplantados e também tem uma atuação em doenças inflamatórias. Essa categoria de medicamentos atua inibindo a divisão celular, apresentando propriedades anti-inflamatórias. O uso dele é recomendado no tratamento de condições como psoríase, pênfigos, penfigoides, linfomas e diversas outras patologias('BRESSAN, 2010).

A imunossupressão teve sua primeira aplicação no final da década de 1950, com a utilização de soros heterólogos que levavam à destruição das células T. Durante a década de 60, houve um progresso no uso de soros antilinfócitos ou antitimócitos, e somente mais tarde foram introduzidos os primeiros fármacos, embora sua atuação fosse pouco específica. O próximo passo envolveu o desenvolvimento desses fármacos e a implementação de procedimentos linfocitotóxicos, visando a eliminar apenas as células imunocompetentes, como descrito por Borel & Hiestand em 1999(BOREL; HIESTAND, 1999).

Nos anos 60, surgiu o primeiro imunossupressor, a 6-mercaptopurina, representando um marco na capacidade de realizar transplantes de órgãos com sucesso. Essa descoberta possibilitou a implementação da imunossupressão necessária para a sobrevivência dos transplantes. Desde então, os métodos de

imunossupressão têm continuamente evoluído. Contudo, é importante notar que a inibição dos mecanismos imunológicos é não específica, tornando o organismo mais suscetível a infecções e tumores que normalmente seriam prontamente reconhecidos e eliminados pelo sistema imunológico (VICENTE, 2008).

1.3 *Lachesis muta*

Serpentes venenosas são espécies capazes de produzir veneno, produzido por glândulas especializadas, utilizado na defesa e alimentação. O veneno é formado por um complexo composto, sendo as toxinas responsáveis pelas lesões observadas nas vítimas do envenenamento. Essas toxinas possuem atividade enzimática e não enzimática, podendo desencadear inúmeros efeitos, como hemorragias, edemas, formações de trombos, vômitos, diarreias graves e outros (INSTITUTO BUTANTAN, 2022).

O gênero *Lachesis* é composto pelas espécies *Lachesis stenophrys*, *Lachesis melanocephala*, *Lachesis muta muta* e *Lachesis muta rhombeata*, sendo apenas as duas últimas encontradas no Brasil, em áreas florestais como Amazônia, Mata Atlântica e alguns enclaves de matas úmidas do Nordeste (ROSENTHAL et al., 2002). É conhecida popularmente como surucucu, pico-de-jaca, surucutinga e malha de fogo. O veneno laquéutico apresenta atividades fisiopatológicas semelhantes às do veneno botrópico, apresentando atividades coagulante (do tipo trombina), hemorrágica (metaloproteinases), inflamatória e necrosante (proteolítica). Além disso, também é relatada uma atividade cininogenase no veneno, que em parte poderia explicar as alterações neurotóxicas. Comparado ao veneno de *Bothrops atrox*, o veneno de *L. muta* possui maior atividade coagulante e menor ação hemorrágica (MARQUES, 2014).

O tratamento mais eficaz no ofidismo é a soroterapia. O antiveneno administrado por via intravenosa representa a única abordagem terapêutica específica para o envenenamento por serpentes, sendo eficaz na neutralização das toxinas circulantes (GUTIÉRREZ et al., 2010).

1.4 Proteína imunossupressora isolada de *L. muta*

A produção do soro anti-laquétrico era uma tarefa complexa, devido à baixa capacidade do veneno de estimular uma resposta imunológica nos animais imunizados. Com isso, um estudo objetivando aumentar a resposta imunogênica do veneno, para a produção do soro em cavalos, foi realizado por STEPHANO et al. (2005). Os autores conseguiram aumentar em quase oito vezes o título de anticorpos anti-veneno com a remoção de frações com fator imunossupressor.

No Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan foi isolado e identificado uma proteína no veneno da serpente *Lachesis muta* com propriedades imunossupressoras, denominada LMVp. O cDNA foi clonado e os procedimentos de expressão e purificação foram estabelecidos, gerando depósito de patentes (PCT processo / BR2014 / 000387, 2014). Com isso, viu-se a necessidade de um melhoramento da expressão da proteína recombinante, de forma que cada etapa fosse otimizada para obtenção da LMVp.

Com a introdução da tecnologia de DNA recombinante, a produção de proteínas recombinantes veio se tornando uma ferramenta essencial para pesquisas sobre a estrutura, função e identificação de novas proteínas. Esse avanço, particularmente aplicado a propósitos terapêuticos, possibilita a fabricação de medicamentos destinados ao tratamento de diversas doenças (VAZ, 2008).

O sistema de expressão em *E. coli*, estabelecido no Laboratório de Imunoquímica, foi utilizado modificando a linhagem bacteriana para BL21STAR DE3 PLYSS, como estratégia central neste trabalho. Esta cepa apresenta diversas características que a torna adequada para a expressão de proteínas recombinante em altos níveis. Isso inclui o rápido crescimento celular em meios mínimos, a baixa produção de acetato durante o cultivo em níveis elevados de glicose, a escassa presença de proteases e a notável capacidade de cultivo em alta densidade (KIM et al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo do presente estudo visa otimizar a expressão e purificação da proteína recombinante LMVp (proteína imunossupressora de *Lachesis muta*).

2.2 Específico

Melhorar o rendimento e a qualidade da proteína recombinante LMVp.

3 METODOLOGIA

3.1 Lista de Reagentes e Soluções

Meio de cultura LB (Sigma-Aldrich - EUA); SOB (2YT , KCL 1M, MgCl₂ 1M , MgSO₄ 1M); Tampão de Equilíbrio (Na₃PO₄ 0,02M, NaCl 0,5M, pH 7,8); Tampão de Lavagem (Na₃PO₄ 0,02M, NaCl 0,5M, pH 6,0); Tampão de Lise (Tris-HCl 100mM pH 8,0, NaCl 300mM); Tampão PBS (10mM Na₂HPO₄, 150mM NaCl, pH 7.2); 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt (BCIP) (Molecular Probes - EUA); Nitro-Blue tetrazolium chloride (NBT) (Molecular Probes - EUA); Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad Lab., EUA); Glicose (Merck Millipore - EUA); IgG anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich - EUA); Imidazol 1M (Sigma-Aldrich - EUA); isopropil-β-D-tio galactopiranosídeo (IPTG) (Invitrogen Life Technologies - EUA); Ampicilina (Sigma-Aldrich - EUA); Meio de cultura 2YT (Invitrogen Life Technologies - EUA); MgCl₂ (Sigma-Aldrich - EUA); MgSO₄ (SigmaAldrich - EUA); Na₂HPO₄ 10mM (Sigma-Aldrich - EUA); NaCl (Merck Millipore - EUA); Na₃PO₄ 0,02M (Sigma-Aldrich - EUA); Triptona (Sigma-Aldrich - EUA); Tris-HCl (Thermo Fisher Scientific - EUA).

3.2 Clone codificante para LMVp

Os cDNA codificante para a proteína imunossupressora (LMVp) foi isolado e clonado da glândula de veneno da serpente *Lachesis muta* pela Dra. Giselle Piddeno Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan. O inserto foi subclonado no vetor *pRSET-A* (Invitrogen, EUA) para expressão em *E. coli* e as condições para expressão e purificação da proteína recombinante foram estabelecidas. Entretanto, o rendimento alcançado até o momento é muito baixo, tornando importante a necessidade de se buscar protocolos otimizados para a obtenção da LMVp.

3.3 Expressão da proteína recombinante

3.3.1 Transformação

Utilizamos bactérias competentes *Escherichia coli*, da linhagem BL21 STAR DE3 PLYSS (Invitrogen, EUA). A transformação foi realizada por choque térmico, resumidamente, as cepas de bactérias competentes foram incubadas com o clone codificante para LMVp, por 30 minutos no gelo, seguido de 45 segundos a 42 °C, e os tubos mantidos no gelo novamente por 5 minutos. Foi adicionado 1mL de SOC (2 % de Bacto-triptona, 0,5% de Extrato de levedura, 12,5 mM de NaCl, 2 mM KCl, 50 mM Mg²⁺, 20 mM glicose) e os tubos foram deixados sob agitação (120 rpm) por uma hora a 37°C. Posteriormente as bactérias transformadas foram plaqueadas com auxílio de alça de Drigalski em meio Luria Bertani (LB) sólido contendo ampicilina 50 mg/mL e incubadas a 37°C por 18h.

3.3.2 Indução de expressão

As Colônias isoladas foram selecionadas aleatoriamente e cultivadas em 5 mL de meio LB líquido, contendo ampicilina 50 mg/mL, durante a noite a 37 °C. Foi realizada uma varredura visual para verificar quais as melhores colônias e condições ideais para a expressão da proteína recombinante.

Os pré-inóculos selecionados visualmente pela turbidez foram transferidos para frascos de erlenmeyer contendo 500 mL de meio de cultura 2YT, contendo ampicilina 50µg/mL e incubado sob agitação a 37°C. Após atingir a densidade óptica desejada, DO_{600nm} entre 0,6 e 0,8, então, foi adicionado 1 mM de IPTG (isopropil-β-D-galactosídeo) e a cultura incubada por mais 4 horas a 37°C sob agitação. A suspensão de bactérias foi submetida a centrifugação por 15 minutos a 5.000rpm a 4°C, sendo concentrado 100mL de cultura bacteriana por tubo (50mL) e o precipitado resultante de bactérias armazenado a -80°C.

3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os perfis proteicos foram determinados por eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Amostras de 20 µl, acrescidas de 20 µl de tampão de amostra reduzido ou não reduzido, foram incubadas a 95°C em termobloco por 10 minutos, sendo aplicadas 20 µl analisadas no gel. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-Glicina, em voltagem constante de 100. Após a corrida, o gel foi corado por azul de Coomassie

(Coomassie Brilliant Blue R-250) ou por impregnação por prata ou, ainda, utilizado no ensaio de Western Blotting.

3.5 Western Blot

As amostras separadas através de SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose, durante 18 h sob refrigeração, utilizando corrente de 150mA.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada em PBS-BSA 5% por 2 horas a 37°C. Posteriormente, lavada com tampão PBS e, em seguida, incubada com o soro anti-LMVp, produzido em camundongo no Laboratório de Imunoquímica, diluído 1:200 em tampão PBS-BSA 1% por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida foram feitas 3 lavagens de 5 min com PBS-TWEEN 0,05% e incubada por 1h à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado fosfatase alcalina (Promega, EUA), diluído 1:7500 em tampão PBS – BSA 1% - TWEEN 0,05% . Depois foram feitas 3 lavagens de 10 min com PBS-TWEEN 0,05%, seguido da revelação utilizando o substrato NBT/BCIP (33 µl de NBT e 16,5 µl de BCIP em 5 mL de tampão fosfato revelador .

3.6 Sonicação

Os precipitados resultantes, correspondentes a 100 mL de cultura bacteriana expressa por tubo, foram ressuspensos em 10 mL de Tampão de Lise e, em seguida, submetidos a lise por meio de sonicação utilizando o equipamento Vibra Cell - High Intensity Liquid Processors da Sonics & Materials, Inc. Diversos testes foram conduzidos, ajustando as configurações para maximizar o rendimento da proteína de interesse, garantindo ao mesmo tempo a qualidade proteica, ao variar os parâmetros como amplitude, tempo ativo, tempo inativo e o número de ciclos. Durante todo o procedimento, a amostra em processo foi mantida em condições de resfriamento em gelo. O protocolo de sonicação central utilizado foi 5 ciclos de 45 segundos ativos intercalados com 30 segundos de pausa, com uma amplitude de 80%, sendo avaliadas variações e repetições pontuais em algumas amostras, com os resultados acompanhados individualmente. A separação das proteínas solúveis e insolúveis ocorreu por meio de centrifugação a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

A presença das proteínas recombinantes nas frações solúveis (sobrenadante) e insolúveis (precipitado) foi verificada por meio de eletroforese em SDS-PAGE.

3.7 Purificação

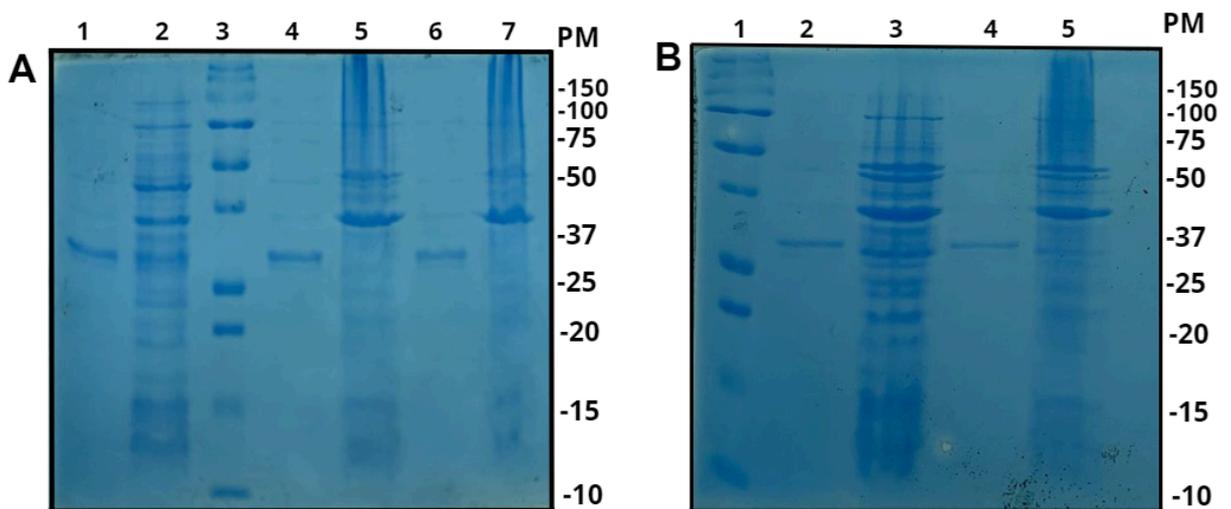
A fim de obter a proteína recombinante de interesse de maneira purificada, o sobrenadante do lisado bacteriano passou por uma etapa de cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de Ni⁺⁺, utilizando o sistema Äkta Start (GE). A proteína recombinante foi eluída e posteriormente analisada por SDS-PAGE e Western Blotting. Foram implementados protocolos de purificação visando obter o melhor rendimento da proteína final, garantindo a ausência de contaminação bacteriana. Em resumo, 10 mL do sobrenadante do lisado bacteriano foi submetido a uma cromatografia em um sistema FPLC, com um fluxo constante de 2,0 mL/min, fazendo uso de uma coluna HisTrapTMFF (Cytiva). A coluna foi inicialmente equilibrada com 5 volumes de tampão de equilíbrio, seguido por 10 volumes de tampão de lavagem. O material adsorvido foi eluído, em frações de 5mL, com o tampão de eluição contendo concentrações crescentes de imidazol 1M. Protocolo: Após equilíbrio da coluna, a etapa de lavagem foi realizada com 10%B, seguida de eluição com as seguintes etapas: 30%B em 2 volumes; 50%B em 1,5 volumes; 100%B em 2 volumes.

4 RESULTADOS

4.1 Expressão

Inicialmente, 12 amostras foram inoculadas para avaliação de desempenho das mini expressões, e a partir delas foram feitas expressões em maior escala. As amostras selecionadas foram: Rec1, Rec2, Rec6, Rec7 e Rec10. Após a indução da expressão da proteína recombinante, é possível verificar o aparecimento de nova banda com aproximadamente 37kDa, nas amostras Rec2, Rec6, Rec7, Rec10. Após a expressão foi feita a análise das amostras, através da eletroforese gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e corado com coomassie (Figura 1 A e B). As expressões foram avaliadas quanto ao reconhecimento pelo anticorpo anti-LMVp, para isso utilizamos o ensaio de western Blot (Figura 2 A e B).

Figura 1: Análise de expressão da proteína recombinante LMVp.



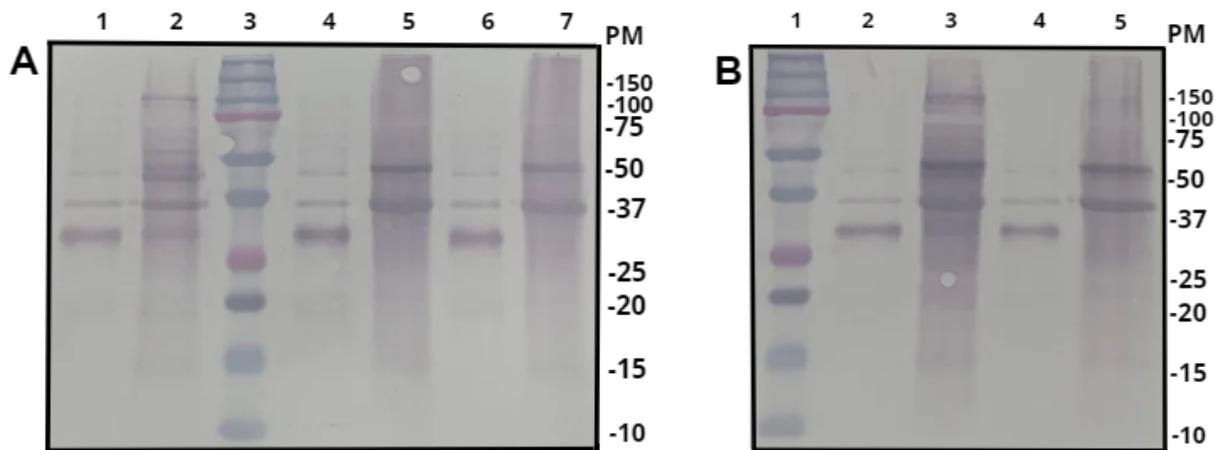
Fonte: O próprio autor, 2023.

Legenda: Expressão da proteína recombinante LMVp em linhagem bacteriana BL21 STAT PLYS, retirada 20 μ l do extrato de bactéria e analisada em gel de SDS-PAGE (12,5 %). NI-Não Induzida, I- Induzida.

A- 1. Rec1-NI, 2. Rec1-I, 3. Peso Molecular, 4. Rec2-NI, 5. Rec2-I, 6. Rec6-NI, 7. Rec6-I.

B- 1. Peso Molecular, 2. Rec7-NI, 3. Rec7-I, 4. Rec10-NI, 5. Rec10-I.

Figura 2: Análise da expressão por *Western Blot*.



Fonte: O próprio autor, 2023.

Legenda: Expressão em linhagem bacteriana BL21, retirada 20 μ l do extrato de bactéria e analisada em Western Blotting. NI-Não Induzida, I- Induzida.

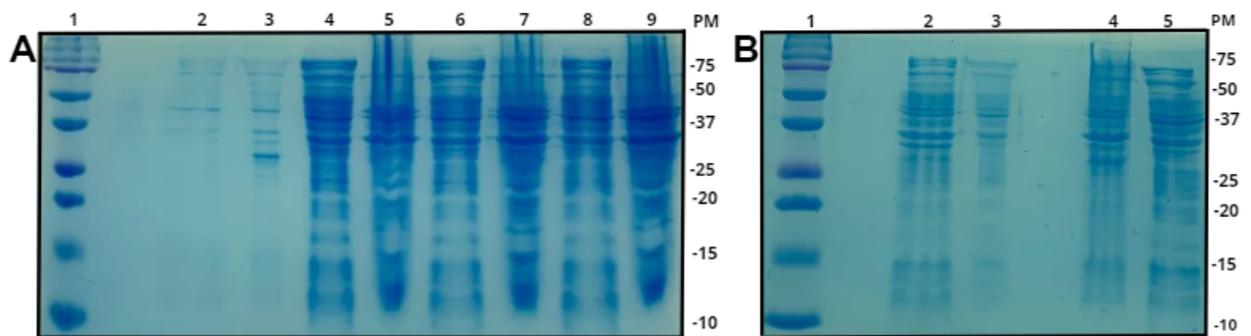
A- 1. Rec1-NI, 2. Rec1-I, 3. Peso Molecular, 4. Rec2-NI, 5. Rec2-I, 6. Rec6-NI, 7. Rec6-I

B- 1. Peso Molecular, 2. Rec7-NI, 3. Rec7-I, 4. Rec10-NI, 5. Rec10-I.

4.2 Sonicação

As amostras foram ressuspensas no tampão de lise e sonicadas e, posteriormente, avaliadas quanto à solubilidade. Diversos protocolos foram utilizados, sendo o protocolo que gerou melhor resultado apresentado nas análises do sobrenadante e *pellet* realizado por eletroforese, onde as amostras Rec2 e Rec6 parecem conter mais proteína na fração solúvel (Figura 3). A amostra Rec2 foi dividida em Rec2 e Rec2B, devido ao volume maior gerado da expressão.

Figura 3: Análise de solubilidade.



Fonte: O próprio autor, 2023.

Legenda: Após a sonicação foi coletado as amostras de sobrenadante e Pellet da sonicação, e analisada em gel de SDS-PAGE (12,5 %). S- Sobrenadante, P- Pelet.

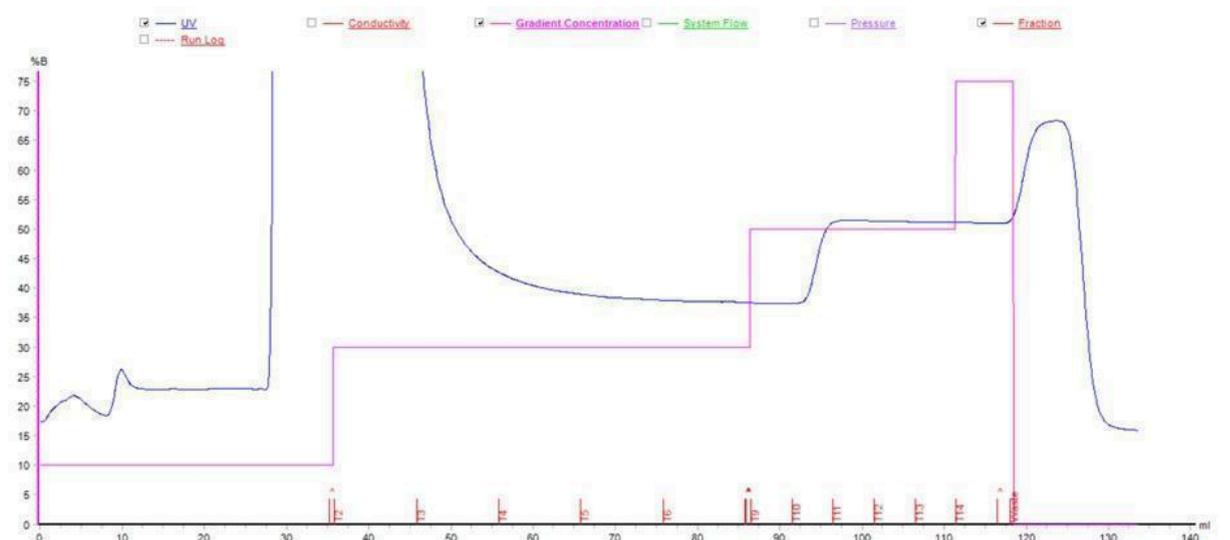
A- 1. Peso Molecular, 2. Rec1-S, 3. Rec1-P, 4. Rec2-S, 5. Rec2-P, 6. Rec2B-S, 7. Rec2B-P, 8. Rec6-S, 9. Rec6-P.

B- 1. Peso Molecular, 2. Rec6-P, 3. Rec6-S, 4. Rec7-P, 5. Rec7-S.

4.3 Purificação

A amostra que apresentou melhor rendimento no processo de solubilização (Rec7) foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna de Ni⁺⁺. O fracionamento gerou 15 amostras, que foram analisadas através da eletroforese gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e impregnada por prata. (Figura 4).

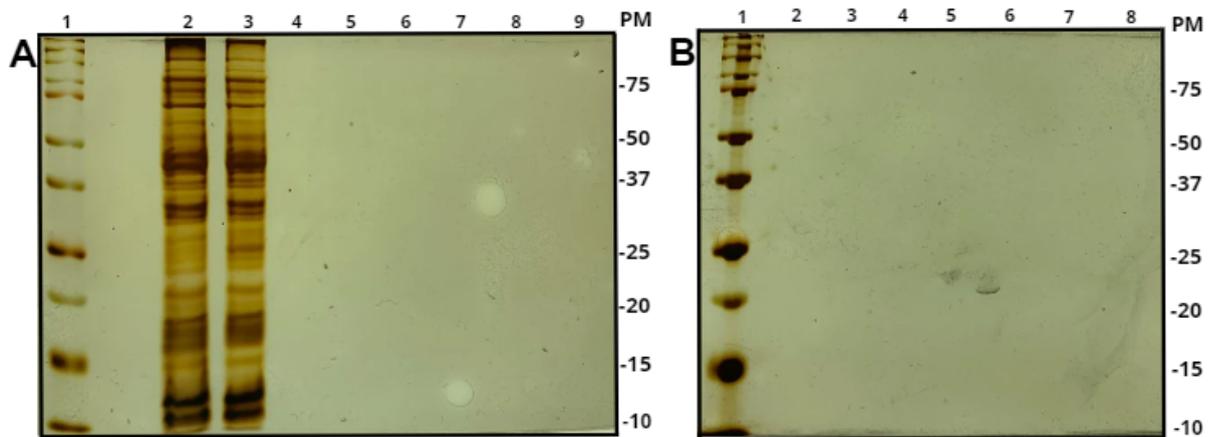
Figura 4: Cromatografia da purificação.



Fonte: O próprio autor, 2023.

Legenda: Cromatografia de afinidade em coluna de Ni⁺⁺ acoplado a sepharose em equipamento Äkta Start - GE. Amostra 10.

Figura 5: SDS-PAGE corado por prata.



Fonte: O próprio autor, 2023.

Legenda: Purificação da amostra 10, gel I com frações de 1 a 15 e analisada em gel de SDS-PAGE (12,5 %) corado por prata.

A- 1- Peso molecular, 2- Fração 1, 3- Fração 2, 4- Fração 3, 5- Fração 4, 6- Fração 5, 7- Fração 6, 8- Fração 7, 9- Fração 8.

B- 1- Peso molecular, 2- Fração 9, 3- Fração 10, 4- Fração 11, 5- Fração 12, 6- Fração 13, 7- Fração 14 e 8- Fração 15.

5 DISCUSSÃO

O método mais difundido para expressar proteínas heterólogas envolve o uso da bactéria *Escherichia coli* como célula hospedeira. Esse sistema é amplamente adotado devido à sua facilidade de cultivo, custos acessíveis e à capacidade reprodutível e abundante de produção de proteínas. Além disso, são frequentemente realizadas modificações nos vetores e linhagens de *E. coli* para aprimorar a eficiência e versatilidade do sistema original. Com o surgimento de novos sistemas de expressão em células de eucariotos, como leveduras, insetos e mamíferos, a expressão de proteínas clonadas tornou-se uma abordagem poderosa, revolucionando os estudos em estrutura, função, purificação e identificação de novas proteínas. Nestes sistemas alternativos, o gene recombinante a ser introduzido no hospedeiro alvo pode ser facilmente construído e amplificado em *E. coli* (NASCIMENTO, 2003)

A produção de proteínas heterólogas comumente emprega a bactéria *E. coli* da linhagem BL21 e suas variantes. Essas cepas passam por várias modificações em suas configurações para mitigar desafios relacionados à expressão e solubilização (TERPE, 2003).

A expressão da LMVp foi feita na cepa bacteriana BL21STAR DE3 PLYSS, diferentemente da cepa utilizada nos primeiros trabalhos com a proteína recombinante no Laboratório de Imunoquímica, que utilizou a cepa Origami (DE3) pLys. O vetor utilizado foi o mesmo, pRSET-A, projetado para expressão procariótica de alto nível, controlada pelo forte promotor do bacteriófago T7 (PRSET A, B, & C ,2023). Esse promotor pode ser estimulado pela introdução do análogo não hidrossolúvel de lactose, denominado isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosose (IPTG). Essa ativação está condicionada à via catabólica da glicose para induzir a lactose, proporcionando, dessa forma, o controle da expressão (Long et al., 2015).

A etapa de sonicação das amostras tem o papel de extrair as proteínas sintetizadas pela bactéria, e envolve, essencialmente, a aplicação de energia ultrassônica na amostra líquida. Esse processo tem como objetivo agitar as partículas e, conseqüentemente, promover a lise das células bacterianas fragmentando seus compostos celulares por meio de ondas sonoras de alta frequência. A sonicação em meio líquido destaca-se como o método mais eficaz, uma vez que as ondas ultrassônicas têm uma propagação mais eficiente nesse

estado físico em comparação com outros. Esse processo desencadeia a cavitação, um fenômeno físico em que as bolhas de gases dispersas no líquido experimentam um aumento gradual na pressão interna devido à oscilação sonora. Em determinado ponto, esse aumento nas dimensões das bolhas culmina em implosões físicas, interagindo com os componentes do substrato e induzindo alterações físicas na estrutura da bactéria (OZUNA et al., 2015)

As amostras obtidas da sonicação foram submetidas a etapa de purificação, na tentativa de separar a proteína de interesse. Para isso, foi empregado o processo de cromatografia por afinidade utilizando uma coluna de níquel (Ni⁺⁺), no qual a afinidade das moléculas-alvo com o íon níquel foi aproveitada para a separação e purificação. A purificação de proteínas e peptídeos, seja de origem nativa ou recombinante, em sua forma biologicamente ativa, representa uma etapa crucial na obtenção de amostras adequadas para estudos estruturais (CHAVES, 2009).

Após a purificação foi feita a análise em gel de SDS-PAGE (12,5 %), e posteriormente corado por impregnação por prata.

Podemos observar a ausência de proteínas na purificação. Provavelmente a perda de proteína recombinante se deu pela pequena quantidade de LMVp no extrato bacteriano submetido a purificação. O resultado obtido neste trabalho demonstra claramente que a cepa testada, BL21, não é um caminho para se seguir. Por outro lado, abre a possibilidade de se testar outras cepas, que podem alcançar uma produção de escala maior, como por exemplo Rosetta (DE3), que vem sendo uma opção de uso por conter o melhoramento entre duas cepas mais amplamente utilizadas.

A cepa *E. coli* Rosetta, apresenta de uma forma promissora entre as cepas Rosetta e Origami, aprimorando a formação de ligações dissulfeto no citoplasma por meio de mutações no sistema redox. Sua capacidade única de expressar tRNAs raros em *E. coli* potencializa significativamente a produção de proteínas heterólogas (SOUZA, 2016).

6 CONCLUSÕES

A metodologia abordada nessa tentativa de melhoramento da expressão e purificação da proteína recombinante LMVp, não foi positiva. Assim, concluindo que não foi possível estabelecer uma metodologia superior a já obtida para a proteína recombinante LMVp, se faz necessário avaliar outras cepas bacterianas, permitindo assim, estudar outros métodos para fazer a otimização e rendimento da LMVp.

REFERÊNCIAS

- BOREL, J. F.; HIESTAND, P. C. **Immunomodulation: Particular perspectives**. Transplantation Proceedings. **Anais...**1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041134599000093?pes=vor> . Acesso em: Outubro/2023.
- 'BRESSANI, A. 'SILVAII, R. 'FONTENELLE, E. 'GRIPP, A. **Imunossuppressores na Dermatologia**. Rio de Janeiro.2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/f9frjGBtBtQwBprRYLVTHyN/?lang=pt&format=pdf> . Acesso em: Dezembro/2023.
- DE PINHO MARQUES JUNIOR, A. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte : [s.n.]. v. 75.1999. Disponível em: <https://vet.ufmg.br/ARQUIVOS/FCK/file/editora/caderno%20tecnico%2075%20animais%20peconhen-tos.pdf> . Acesso em: Outubro/2023.
- GUTIÉRREZ, J. M. et al. **Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach**. **Toxicon**, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010109005510?pes=vor> . Acesso em: Dezembro/2023.
- HALLER, O.; KOCHS, G.; WEBER, F. **The interferon response circuit: Induction and suppression by pathogenic viruses**. **Virology**, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16364743/> . Acesso em: Novembro/2023.
- INSTITUTO BUTANTAN. São Paulo, 1901-2023. Disponível em: <https://www.butantan.gov.br/> Acesso em: Novembro/2023.
- KIM, S. et al. Genomic and transcriptomic landscape of Escherichia coli BL21(DE3). **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 9, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28379538/> . Acesso em: Novembro/2023.
- MOREIRA, C. Linfócitos. **REVISTA DE CIÊNCIA ELEMENTAR**, V2(01):091. Disponível em: <https://doi.org/10.24927/rce2014.091> . Acesso em Outubro de 2023. 2014.
- MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. P 177-185. Ed 7. MAR. 2010. Disponível em: https://tga.blv.ifmt.edu.br/media/filer_public/d3/b4/d3b4a4a2-eeeb-4c1e-8483-0176fd79a0c7/murphy_-_imunobiologia_de_janeway_-_7ed_-_2010.pdf . Acesso em: Novembro/2023.
- NASCIMENTO, A. E. E. M. L. M. L. M. N. M. N. M. R. R. **TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE**. Ribeirão Preto.2003. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5652884/mod_resource/content/1/Apostila%20DNA%20Recombinante%20profa%20Enilza.pdf . Acesso em: Dezembro/2023.
- NETEA, M. G.; QUINTIN, J.; VAN DER MEER, J. W. M. **Trained immunity: A memory for innate host defense**. **Cell Host and Microbe**, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312811001284?pes=vor> . Acesso em: Dezembro/2023.
- OZUNA, C. et al. **Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides**. **Food**

Research International, 2015. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399691530226X?pes=vor> . Acesso em: Dezembro/2023.

REZENDE, J. M. DE. Imunodepressão, imunossupressão. **Rev. patol. trop**, v. 40, n. 2, 2011. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/iptsp/article/view/14946>. Acesso em: Novembro/2023.

ROBERTA VIANA ARAÚJO CHAVES. **Avaliação de dois clones de Escherichia coli recombinante quanto ao crescimento e expressão de antígenos de Leishmania chagasi (kmp11 e P36)**. Rio Grande do Norte .2009. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/15787> . Acesso em: Novembro/2023.

ROSENTHAL, R. et al. Intestinal ischemia after bushmaster (Lachesis muta) snakebite - A case report. **Toxicon**, v. 40, n. 2, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010101002033?pes=vor> . Acesso em: Dezembro/2023.

SOUZA, J. **Impacto da mutação BCG Moreau-específica em PhoR na sua atividade histidina kinase**. Rio de Janeiro.2016. Disponível em: <http://www.repositorio-bc.unirio.br:8080/xmlui/handle/unirio/11297> . Acesso em: Dezembro/2023.

STEPHANO, M. A. et al. The improvement of the therapeutic anti-Lachesis muta serum production in horses. **Toxicon**, v. 45, n. 4, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010104005021?pes=vor> . Acesso em: Dezembro/2023.

TERPE, K. **Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems**. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2003. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00253-002-1158-6.pdf> . Acesso em: Dezembro/2023.

VAZ, M. R. F. M. G. R. DE. **Estudo do cultivo de dois clones de Escherichia coli recombinantes para a expressão de antígenos da Leishmania chagasi**. Rio Grande do Norte.2008. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/15741?mode=full> . Acesso em: Outubro/2023.

VICENTE, F. ALEXANDRE. B. L. **Transplantação Renal: Mecanismos de Rejeição e Tolerância**. Covilhã.2008. Disponível em: <https://ubibliorum.ubi.pt/bitstream/10400.6/869/1/Tranplanta%C3%A7%C3%A3o%20Renal.pdf> . Acesso em: Dezembro/2023.