

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

EXPRESSÃO RECOMBINANTE DA CANACISTATINA
EM CÉLULAS DE INSETO

Mylene de Melo Silva

SÃO CARLOS-SP

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

EXPRESSÃO RECOMBINANTE DA CANACISTATINA
EM CÉLULAS DE INSETO

Mylene de Melo Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

SÃO CARLOS-SP

2007

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S586er

Silva, Mylene de Melo.

Expressão recombinante da canacistatina em células de inseto / Mylene de Melo Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2007. 74 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Genética molecular. 2. Cana-de-açúcar. 3. Canacistatina. 4. Baculovírus. 5. Células de inseto. 6. Cistatina. I. Título.

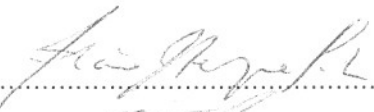
CDD: 574.87328 (20^a)


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**“EXPRESSÃO RECOMBINANTE DA CANACISTATINA EM CÉLULAS
DE INSETO”.**

Dissertação de Mestrado de Mylene de Melo Silva

Banca Examinadora

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva.....

Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann.....

Prof. Dr. Mauricio Bacci Junior.....

“Todo aquele que semeia alegria, coragem, justiça, lealdade e, sobretudo, amor... jamais há de sentir que a vida lhe deu pouco e que a jornada foi árdua, deserta, íngreme, difícil...”

Autor desconhecido

Aos meus pais que tanto me apoiaram para que essa jornada fosse menos árdua, deserta e íngreme, dedico mais esta vitória.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Flávio Henrique Silva, pela orientação e oportunidade de trabalhar numa área tão fascinante como a Biologia Molecular.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução (PPGGEV), da Universidade Federal de São Carlos, pela oportunidade de execução do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa e à Fapesp pelo financiamento do projeto (CEPID/CBME).

À Professora Dra. Adriana K. Carmona (UNIFESP-SP) pela colaboração e atenção dispensadas e a Simone Cotrin (UNIFESP-SP), pela grande ajuda nos experimentos de atividade da proteína.

Ao Professor Dr. Cláudio A. T. Suazo (LATECC – UFSCar-SP), pelo fornecimento das células e pela disponibilidade do laboratório.

Ao Professor Dr. Bergmann Moraes Ribeiro (UnB-DF), pelos esclarecimentos que tanto contribuíram para o meu trabalho.

Às secretárias do PPGGEV, em especial à Regiane, pela paciência e auxílios prestados.

A todos os amigos do laboratório, pela solidariedade; em especial a Vivi, Déia e Wendy, pelo acolhimento desde a minha chegada em São Carlos e pela amizade e ajuda em todos os momentos; a Carol, Márcia e Kelly, pela amizade, carinho e apoio moral durante esses dois anos; a César e Andréa pelos ensinamentos em diferentes fases da minha pesquisa.

A Mabel, pela grande ajuda, colaboração e amizade em grande parte do meu trabalho.

Às minhas colegas de república Ju, Iza e Ana e a todas as outras que tive o prazer de conviver, que de alguma forma foram minha família em São Carlos.

Aos meus amigos de longe, pela presença constante na minha vida, me apoiando e me ensinando o verdadeiro sentido da palavra amizade.

A toda minha família e aos meus irmãos, Nayra e Anderson, pelo apoio, carinho, paciência e confiança.

Aos meus pais, pelo amor e dedicação em todos os momentos da minha vida e pela confiança e incentivo nos últimos anos.

A Deus, pelo dom da vida e pela força que me impulsiona a vencer desafios e conquistar objetivos.

Enfim, a todos que duvidaram, mas, sobretudo aos que confiaram no meu sucesso, dando-me coragem e confiança na vitória.

... MEUS MAIS SINCEROS AGRADECIMENTOS.

i – RESUMO

Devido à grande importância da cultura da cana-de-açúcar no Brasil, a ocorrência de infecções por fitopatógenos constitui um grave problema que acarreta queda na produtividade e na qualidade da lavoura canavieira. Uma vez que as plantas têm mecanismos naturais de defesa contra o ataque de fungos e insetos, dentre os quais se destacam os inibidores de proteases, a utilização dessas substâncias no desenvolvimento de plantas resistentes ou na produção de pesticidas seria uma alternativa interessante. Um tipo de inibidor de protease que atua na proteção contra o ataque de patógenos e como proteínas de reservas em algumas sementes são as cistatinas, proteínas que inibem especificamente cisteíno-proteases. A Canacistatina foi o primeiro inibidor de cisteíno-protease caracterizado originado da cana-de-açúcar. Apesar de já ter sido anteriormente produzida em sistema bacteriano de expressão, a Canacistatina foi utilizada, nesse trabalho, como modelo de estudo para implementação do sistema de expressão de proteínas heterólogas em células de inseto. Esse sistema apresenta algumas vantagens sobre o sistema procariótico como a possibilidade de realizarem modificações pós-traducionais. A proteína recombinante foi expressa nesse sistema na forma solúvel e purificada em cromatografia de afinidade em coluna de níquel, resultando em um rendimento de 23 gramas por litro de cultura. A proteína purificada foi submetida a testes de inibição enzimática contra a papaína, sendo capaz de inibir satisfatoriamente a atividade dessa cisteíno-protease. Também foram realizados testes de estabilidade desse inibidor em diferentes condições de pH e temperatura, mostrando-se estável. A Canacistatina foi um modelo de estudo adequado para a implementação do sistema de expressão de proteínas no Laboratório de Biologia Molecular da UFSCar.

ii – ABSTRACT

Due to the great economic importance of sugarcane crop in Brazil, the occurrence of infections by phytopathogens leading to decreased productivity and quality remains a serious problem. As the plants have natural mechanisms of defense against the attack of fungi and insects, amongst which the inhibitors of proteases are distinguished, the use of these substances in the development of resistant plants or in pesticide production may be an interesting alternative. One of the major classes of protease inhibitors acting against the attack of pathogens is the cystatins, proteins that inhibit cysteine proteases specifically. Canecystatin was the first cysteine protease inhibitor characterized from sugarcane. This gene codes for a ~ 14 kDa protein that contains conserved regions common to the cystatin family. Although the protein has previously been produced in a bacterial system of expression, in this work we use this sugarcane cystatin as a model for the implementation of a heterologous protein expression system in insect cells. This system has some advantages relatively to the prokaryotic system such as the possibility of posttranslational modifications. The recombinant protein was expressed in this system in a soluble form and purified using affinity chromatography in a nickel column, rendering approximately 23 mg/L of pure protein. The activity of the protein was assayed against papain, being capable of inhibiting the activity of this cysteine protease efficiently. Furthermore, the stability of the protein was analyzed in different conditions of pH and temperature. We conclude that the canecystatin is a good model for the implementation of the Baculovirus Expression System at the Molecular Biology Laboratory of the UFSCar.

SUMÁRIO

<u>1 – INTRODUÇÃO</u>	1
1.1 – CANA-DE-AÇÚCAR	1
1.2 – PRAGAS E PATÓGENOS DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	2
1.2.1 – PROTEASES.....	5
1.2.1.1 – CISTEÍNO-PROTEASES.....	6
1.3 – PROTEÍNAS DE DEFESA DAS PLANTAS.....	7
1.3.1 – PROTEÍNAS INIBIDORAS DE PROTEASES.....	8
1.3.1.1 – INIBIDORES DE CISTEÍNO-PROTEASES – CISTATINAS.....	9
1.3.1.1.1 – CISTATINAS DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	13
1.4 – CÉLULAS DE INSETO: UMA ALTERNATIVA PARA A PRODUÇÃO DE CANACISTATINA RECOMBINANTE.....	14
 <u>2 – OBJETIVOS</u>	 21
 <u>3 – MATERIAIS E MÉTODOS</u>	 22
3.1 – MATERIAIS.....	22
3.2 – MÉTODOS.....	23
3.2.1 – Isolamento da ORF da Canacistatina.....	23
3.2.2 – Subclonagem do gene Canacistatina no vetor de expressão.....	24
3.2.3 – Construção dos bacmídeos recombinantes.....	27
3.2.4 – Transfecção das células de inseto.....	28
3.2.5 – Determinação do Título Viral por <i>End-Point Dilution</i>	31
3.2.6 – Extração de DNA de <i>Budded Virus</i>	32
3.2.7 – Extração de RNA de Células de Inseto.....	33
3.2.8 – Expressão da proteína Canacistatina recombinante.....	33
3.2.9 – Purificação da proteína Canacistatina recombinante.....	35
3.2.10 – Determinação da concentração da proteína purificada.....	36
3.2.11 – Teste de inibição enzimática de proteases com a proteína purificada.....	37
3.2.12 – Determinação da estabilidade da Canacistatina recombinante.....	38
3.2.12.1 – Estabilidade em diferentes valores de pH.....	38

3.2.12.2 – Estabilidade térmica.....	38
<u>4 – RESULTADOS</u>	39
4.1 – Isolamento da ORF da Canacistatina e subclonagem no vetor pFastBac HT B.....	39
4.2 – Obtenção dos bacmídeos recombinantes.....	41
4.3 – Titulação do estoque baculoviral P2.....	42
4.4 – Confirmação da inserção do bacmídeo no genoma das células de inseto.....	43
4.5 – Expressão da proteína Canacistatina recombinante em células de inseto e posterior purificação.....	44
4.6 – Ação inibitória da proteína Canacistatina contra a papaína.....	47
4.7 – Determinação da estabilidade da Canacistatina recombinante.....	47
4.7.1 – Estabilidade em diferentes valores de pH.....	47
4.7.2 – Estabilidade térmica.....	48
<u>5 – DISCUSSÃO</u>	49
5.1 – Isolamento da ORF da Canacistatina e subclonagem no vetor pFastBac HT B.....	49
5.2 – Obtenção dos bacmídeos recombinantes.....	51
5.3 – Geração dos baculovírus recombinantes.....	54
5.4 – Expressão e purificação da proteína Canacistatina recombinante.....	57
5.5 – Ação inibitória da proteína Canacistatina contra a papaína.....	59
5.6 – Estabilidade da proteína Canacistatina em pH e temperatura.....	60
<u>6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	62
<u>7 – CONCLUSÕES</u>	63
<u>8 – BIBLIOGRAFIA</u>	64
<u>ANEXO</u>	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inseto <i>Diatraea Saccharalis</i> em diferentes estágios do ciclo de vida.....	3
Figura 2. Cana-de-açúcar apresentando uma galeria aberta pela larva da <i>D. saccharalis</i>	4
Figura 3. Estrutura 3D do complexo inibitório formado pela estefina B e pela papaína.....	10
Figura 4. Inseto <i>Spodoptera frugiperda</i> em diferentes estágios do ciclo de vida.....	16
Figura 5. Formas virais do vírus da nucleopoliedrose.....	17
Figura 6. Mapa do vetor de expressão pFastBac HT B.....	26
Figura 7. Sítio de Múltipla clonagem do vetor pFastBac HT B.....	26
Figura 8. Esquema ilustrativo da célula competente DH10Bac.....	27
Figura 9. Amplificação da ORF da Canacistatina a partir do plasmídeo pET28a- Canacistatina.....	39
Figura 10. Amplificação do plasmídeo de expressão pBAC-CaneCPI por PCR de colônia...	40
Figura 11. Amplificação dos bacmídeos recombinantes.....	42
Figura 12. Amplificação do gene da Canacistatina a partir do DNA extraído de <i>Budded</i> <i>virus</i> BV).....	43
Figura 13. Amplificação do cDNA de Canacistatina obtido a partir de células de inseto.....	44
Figura 14. Visualização da purificação da proteína recombinante em resina Ni-NTA.....	45
Figura 15. <i>Western blot</i> da purificação da proteína recombinante.....	46
Figura 16. Gráfico da determinação da estabilidade do inibidor Canacistatina em diferentes condições de pH.....	47
Figura 17. Gráfico da determinação da estabilidade do inibidor Canacistatina após trata- mento em diferentes temperaturas.....	48
Figura 18. Região do plasmídeo de expressão mostrando o promotor da poliedrina, seqüên- cia que codifica para a cauda de histidina, sítio de reconhecimento à protease TEV e o sítio de múltipla clonagem.....	50
Figura 19. Diagrama ilustrando o posicionamento do cassete de expressão inserido no sítio receptor de transposição do bacmídeo.....	53
Figura 20. Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da construção do vetor pBAC- CaneCPI.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tamanhos esperados dos produtos de PCR usando diferentes combinações de <i>primers</i> para bacmídeos contendo o gene de interesse após transposição.....	41
Tabela 2 – Planilha de cálculo do título viral do estoque baculoviral P2.....	42
Tabela 3 – Comparação do rendimento da proteína Canacistatina produzida nos sistemas de expressão bacteriano e baculovírus/células de inseto.....	46
Tabela 4 – Características normalmente observadas em células de inseto infectadas por vírus.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

°Brix	Teor de sólidos solúveis por cento de caldo
°C	Graus Celsius
6xHis	Seqüência de seis resíduos de Histidina
AcMNPV	<i>Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus</i>
AcNPV	<i>Autographa californica Nucleopolyhedrovirus</i>
Ala-10	Resíduo de Alanina na posição 10 das cistatinas
anti-IgG mouse	Anticorpo anti-imunoglobulina G de rato
Asn-175	Resíduo de Asparagina na posição 175 da cisteíno-protease papaína
BV	<i>Budded Virus</i>
cDNA	DNA complementar ao RNA mensageiro
cel/ml	Células por mililitro
C-terminal	Região carboxi-terminal da proteína
Cys-25	Resíduo de Cisteína na posição 25 da cisteíno-protease papaína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleosídeos 5'-trifosfatados (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
DTE	1,4 – Dithioerytritol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ESTs	Seqüências Expressas (<i>Expressed Sequence Tags</i>)
g	gramas
Gly-8	Resíduo de Glicina na posição 8 das cistatinas
His-159	Resíduo de Histidina na posição 159 da cisteíno-protease papaína
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídico
kb	Quilobases
kDa	Quilo Dalton
Ki	Constante de inibição
Ki _{app}	Constante de inibição aparente
lacZ	Gene que codifica para a enzima β-galactosidase

LB	Meio de cultura Luria-Bertani
M	Molar
m	mili (10^{-3})
mA	mili-Ampaire
mg	Miligramas
mini-att Tn7	Sítio Receptor de Transposição presente no Bacmídeo
miniTn7 (Tn7R e Tn7L)	Sítios Doadores de Transposição presentes no Plasmídeo de Expressão
ml	Militros
mM	Milimolar
MNPV	<i>Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus</i>
MOI	Multiplicidade de Infecção (<i>Multiplicity of Infection</i>)
n	nano (10^{-9})
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramas
Ni	Níquel
Ni-NTA	Níquel-Ácido Nitriloacético
nm	Nanômetros
N-terminal	Região amino-terminal da proteína
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
OV	<i>Occluded Virus</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pfu	Unidades Formadoras de Placa (<i>plaque forming units</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PH	Promotor da Poliedrina
pmoles	Picomoles
PRPs	Proteínas Relacionadas à Patogênese
rpm	Rotações por Minuto
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
<i>S. frugiperda</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SNPV	<i>Single Nuclear Polyhedrosis Virus</i>
SUCEST	<i>Sugarcane ESTs Project</i>
TCID50	Dose que infecta metade da cultura de tecidos
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
V	volts
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactosídeo
Z-FR-MCA	Carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-7-amido-4metilcomarina
μ	micro (10^{-6})
μ L	Microlitros

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar é uma planta monocotiledônea originária do Sudeste da Ásia. Foi inicialmente caracterizada por Bacchi em 1983 como uma gramínea perene pertencente ao gênero *Saccharum L.*, da tribo Andropogoneae, família Gramineae. Seu plantio em larga escala é tradicional em vários países das regiões tropical e subtropical para a produção de açúcar, álcool e outros subprodutos (COSTA-LIMA *et al*, 2001; ALMEIDA *et al*, 1995).

No Brasil, essa cultura foi introduzida 32 anos após o descobrimento pela expedição de Martim Afonso de Souza, inicialmente na capitania de São Vicente (São Paulo). Posteriormente, se estabeleceu nas capitanias da Bahia e de Pernambuco, principalmente, onde foi implantado o primeiro centro açucareiro do Brasil. Devido às condições climáticas favoráveis, ao solo altamente fértil e à mão-de-obra escrava trazida da África, a cultura canavieira tornou-se a principal atividade econômica do Brasil, na época colônia de Portugal, despontando como o maior produtor de açúcar do mundo (BARSALOBRES, 2004).

A cana-de-açúcar é uma cultura que produz, em um curto período de tempo, um alto rendimento de matéria verde, energia e fibras, sendo considerada uma das plantas com maior eficiência fotossintética (COSTA-LIMA *et al*, 2001). Além disso, consiste em uma matéria-prima de grande flexibilidade, permitindo a produção de açúcar (de várias formas e tipos) e álcool (anidro e hidratado), bem como a fabricação de bebidas (como cachaça, rum e vodka) e a geração de energia elétrica a partir do bagaço via indústria alcoolquímica. Dessa forma, observa-se que a cana-de-açúcar, assim como o petróleo, gera uma gama

considerável de produtos, os quais têm a vantagem de serem biodegradáveis e menos ofensivos ao meio ambiente (MARRIS, 2006).

Atualmente, o setor sucroalcooleiro conta com aproximadamente 350 indústrias de açúcar e álcool que respondem por uma produção anual de aproximadamente 300 milhões de toneladas, além de serem responsáveis pela geração de cerca de um milhão de empregos diretos (ALVES e BACCHI, 2004).

No contexto nacional, a agroindústria canavieira se destaca dos demais países por produzir, em escala industrial, tanto açúcar quanto álcool, ocupando posição de destaque entre as principais culturas quanto à área plantada (cerca de quatro milhões de hectares cultivados) e ao volume e valor da produção. No cenário internacional, a representatividade do produto brasileiro aumentou de forma expressiva nos últimos anos e o Brasil, depois de diversas crises no setor sucroalcooleiro, voltou a configurar como o maior produtor de açúcar do mundo (24% do total), bem como o maior exportador mundial desse produto (ALVES e BACCHI, 2004; FERNANDES *et al*, 2003).

Apesar da alta produtividade e qualidade da cana-de-açúcar no Brasil, vários problemas relacionados a fatores climáticos e ataque de pragas e patógenos, entre outros, resultam em sérios prejuízos para os produtores e para a economia sucroalcooleira em geral.

1.2 – PRAGAS E PATÓGENOS DA CANA-DE-AÇÚCAR

Já foram descritas cerca de 216 doenças que afetam os canaviais das quais 38 foram encontradas no Brasil, sendo 10 de grande importância para os produtores.

Entre as pragas que afetam a cultura da cana-de-açúcar, a principal delas é a *Diatraea saccharalis*, popularmente conhecida como broca-da-cana (figura 1), uma mariposa

da ordem Lepidóptera, família Crambidae que está presente em todas as regiões canavieiras do Brasil (SGRILLO *et al*, 1979 *apud* BARSALOBRES, 2004). As larvas da mariposa penetram nas gemas laterais e abrem galerias no colmo da planta (figura 2), o que ocasiona perda de peso das plantas e morte das gemas, além de permitir a penetração de fungos patogênicos como o *Colletotrichum falcatum* e o *Fusarium moniliforme*. Esses fungos ocasionam uma doença chamada “podridão vermelha do colmo”. As plantas afetadas reagem produzindo substâncias de defesa, que promovem a inversão da sacarose, diminuindo a pureza do caldo, o teor de sólidos solúveis (°Brix) e o rendimento na produção de açúcar e álcool (GALLO, 1988; MÉLO, 1984 *apud* BARSALOBRES, 2004).

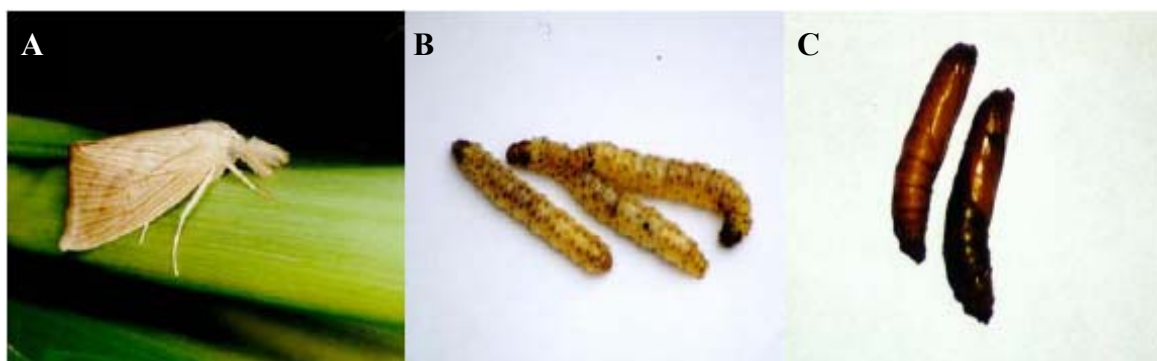


Figura 1. Inseto *Diatraea Saccharalis* em diferentes estágios do ciclo de vida: (A) Adulto; (B) Estágio larval; (C) Pupas. Fonte: Barsalobres, 2004.



Figura 2. Cana-de-açúcar apresentando uma galeria aberta pela larva da *D. saccharalis*.
Fonte: www.agricomseeds.com.

De acordo com diversos estudos, esses fungos patogênicos, assim como diversos outros patógenos de plantas, secretam proteases digestivas em meio de cultura, quando cultivadas *in vitro* (DOBINSON *et al*, 1997). A função exata dessas proteases em fungos ainda é pouco conhecida. Entretanto, sua importância durante o processo de infecção dos tecidos das plantas tem sido esclarecida por alguns estudos. De acordo com os estudos de BALL *et al* (1991) *apud* SOARES-COSTA (2004), por exemplo, o fungo patogênico *Pyrenopeziza brassicae*, que infecta o espaço subcuticular das folhas, perde sua capacidade de induzir lesões nas plantas, após sofrerem mutações que as impedem de produzir proteases extracelulares. Já os resultados do estudo de GVOZDEVA *et al* (2006) sugerem que proteases extracelulares produzidas por *Rhizoctonia solani* Kuhn., um outro fungo patogênico, exercem um papel significativo no ataque de tecidos de plantas e que inibidores naturais contribuem para proteção de *Solanaceae* e *Leguminosae* contra este fungo patogênico.

1.2.1 – PROTEASES

As proteases, também chamadas de enzimas proteolíticas ou proteinases são enzimas pertencentes à classe 3, das hidrolases, que utilizam a água na formação do produto. Essas enzimas catalisam a clivagem hidrolítica de ligações peptídicas em proteínas, ocorrendo a transferência de componentes do substrato para a água (WHITAKER, 1994 *apud* FEDATTO, 2004). Dessa forma, causam alterações irreversíveis dos substratos que podem ser importantes em vários processos fisiológicos e patológicos, através do controle da síntese e degradação de proteínas (LEUNG-TOUNG *et al*, 2002).

A maioria das proteínas é degradada por proteases celulares. Essa degradação ocorre quando as proteínas se esgotam ou são danificadas, ou ainda quando seus constituintes, carbono e nitrogênio, são necessários ao organismo, e em resposta a sinais ambientais ou celulares específicos. Em cada caso, a proteólise é um processo específico e altamente regulado (ESTELLE, 2001).

Por meio da hidrólise, essas enzimas proteolíticas atuam também no metabolismo das proteínas, participando de processos tais como *turnover* da matriz extracelular, regulação de funções celulares fundamentais como apoptose, crescimento celular, ativação e secreção de proteínas e fagocitose. Nos tecidos e órgãos, as proteases influenciam mecanismos como migração celular e invasão, interações celulares e transdução de sinais, assim como formação e estabilização de tecidos (BUHLING *et al*, 2006).

Um dos principais papéis das enzimas proteolíticas, entretanto, é nutricional, uma vez que hidrolisam grandes cadeias polipeptídicas em pequenas moléculas, que são mais facilmente absorvidas pelas células (SOGART, 1983 *apud* FEDATTO, 2004).

Um outro papel importante das proteases está relacionado com a patogenicidade, causando danos diretos nos tecidos ou aumentando a capacidade de invasão de patógenos, como no caso dos fungos patogênicos anteriormente citados (SAKAI, 1985).

De acordo com o grupo reativo envolvido na catálise presente em seu sítio ativo, bem como seu mecanismo de ação, extensão do pH ótimo, similaridades de seqüências e estruturas, as proteases são agrupadas em cinco categorias: cisteíno-proteases, serino-proteases, metalo-proteases, aspartil-proteases e treonino-proteases (BARRET, 2004).

1.2.1.1 – CISTEÍNO-PROTEASES

A família das cisteíno-proteases consiste de uma gama de enzimas com diferentes especificidades, com estruturas terciárias diferentes e funções biológicas distintas. Compreendem mais de quarenta famílias, agrupadas em, no mínimo, seis superfamílias, de acordo com a seqüência de aminoácidos e os domínios conservados (MENARD, 1993; GRUDKOWSKA e ZAGDANSKA, 2004).

As cisteíno-proteases tem sido encontradas em vírus e procariotos, assim como em organismos superiores como plantas e mamíferos, incluindo humanos. Uma grande parte das cisteíno-proteases de planta pertence à família das papaínas. As proteases desse grupo são geralmente exemplificadas pela papaína, a enzima de planta mais bem caracterizada do grupo, isolada do látex da *Carica papaya*.

A atividade proteolítica de todas as cisteíno-proteases depende da presença, em seu sítio ativo, de uma díade catalítica composta por um resíduo de cisteína (Cys-25) e um resíduo de histidina (His-159). No caso das cisteíno-proteases da família da papaína, o centro catalítico é complementado por uma asparagina (Asn-175), a qual assegura o

posicionamento ideal da histidina para estágios sucessivos de hidrólise (RZYCHON *et al*, 2004).

Devido à importância desse tipo de enzima em processos fisiológicos e à sua participação em processos patológicos envolvendo vírus, bactérias, fungos e insetos fitopatogênicos e em doenças de grande interesse na medicina como AIDS e câncer, sua inibição por meio da ação específica de proteínas inibidoras vem atraindo a atenção de muitos pesquisadores.

1.3 – PROTEÍNAS DE DEFESA DAS PLANTAS

As plantas em geral, incluindo a cana-de-açúcar, sofrem constantes agressões por agentes abióticos e bióticos tais como vírus, bactérias, fungos e insetos. Diante dessas agressões, as plantas desenvolvem uma série de mecanismos de defesa, que incluem barreiras físicas e químicas. Dentre esses mecanismos estão as respostas localizadas e as respostas sistêmicas. As respostas localizadas como oxidação, troca iônica e descompartimentalização ocorrem dentro do tecido imediatamente após a invasão do organismo (STASKAWICZ, 1995 *apud* JOSHI *et al*, 1998). Já as respostas sistêmicas abrangem modificações na parede celular, produção de fitoalexinas tóxicas e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) (ABELS, 1970 e BOLLER, 1983 *apud* JOSHI *et al*, 1998) e de proteínas inibidoras de proteases.

As proteínas inibidoras de proteases, em particular, vêm despertando grande interesse de pesquisadores, devido ao seu envolvimento em diversas funções do metabolismo celular e em desordens patológicas e fisiológicas (WOLF, 1992). Segundo alguns estudos, os inibidores de proteases podem ser utilizados para o controle específico de proteases na

interação planta-patógeno contra insetos herbívoros, fungos e nematódeos patogênicos (LORITO *et al*, 1994; RYAN 1990; ATKINSON *et al*, 1995). Dessa forma, essas proteínas vêm apresentando grande potencial tanto no desenvolvimento de plantas transgênicas quanto em seu uso direto nas plantas como fungicidas. Essas abordagens correspondem às novas tendências da sociedade voltadas para a utilização de uma agricultura que reduza a utilização de produtos químicos.

1.3.1 – PROTEÍNAS INIBIDORAS DE PROTEASES

Ao longo da evolução, as plantas parecem ter desenvolvido mecanismos de defesa contra proteases de fungos e insetos. Um desses mecanismos é a produção de proteínas inibidoras de proteases que agem de forma específica sobre as proteases digestivas dos insetos, resultando em proteólise limitada e extremamente lenta (TIFFIN e GAUT, 2001). Essa ação antimetabólica dos inibidores de protease causa deficiências protéicas nos patógenos devido à redução da disponibilidade de aminoácidos. Isso afeta seu crescimento, desenvolvimento e reprodução, podendo levá-los até mesmo à morte (BRODWAY e DUFFEY, 1986).

Os níveis dessas proteínas em folhas são normalmente baixos, podendo ser rapidamente induzidos a níveis elevados quando as plantas são atacadas por insetos ou quando sofrem danos mecânicos (RYAN, 1990; RAKWAL *et al*, 2001).

Atualmente, já foram identificadas proteínas inibidoras para as quatro classes de proteases mais comuns. Entretanto, os inibidores de serino e cisteíno-proteases são os mais amplamente distribuídos em tecidos de reserva das plantas, atuando tanto na função de

proteção contra o ataque de patógenos, quanto como proteínas de reserva em algumas sementes.

1.3.1.1 – INIBIDORES DE CISTEÍNO-PROTEASES – CISTATINAS

Inibidores de cisteíno-proteases são proteínas que inibem especificamente as cisteíno-proteases da superfamília papaína, atuando por meio de inibição competitiva. Inicialmente, estes inibidores foram identificados em clara de ovo de galinha. Atualmente, as cistatinas já foram descritas em diversos outros animais (ANASTASI *et al*, 1983 *apud* ABRAHAMSON, 1993), além de plantas monocotiledôneas (ABE *et al*, 1987) e dicotiledôneas.

As cistatinas vêm sendo extensivamente investigadas devido às suas funções fisiológicas e à sua interação reversível com as proteases. As cistatinas de origem animal atuam, provavelmente, na proteção das células e tecidos contra proteases lisossomais que são liberadas ocasionalmente na morte celular. Em mamíferos, estão envolvidas em processos biológicos e patológicos como invasão de tumor, inflamação, processamento de antígeno, distrofia, metástase e respostas imunomodulatórias (SHYU *et al*, 2004 b).

Em todas as cistatinas de origem animal e vegetal, três regiões conservadas estão presentes, incluindo um resíduo de glicina na região N-terminal, um motivo QXVXG (*loop* central) e uma seqüência PW próximo ao C-terminal (*segundo loop*) (TURK *et al*, 1997; MARGIS *et al*, 1998). Estas três regiões têm sido sugeridas como as regiões que interagem diretamente com os sítios ativos das cisteíno-proteases da família papaína (NAGATA *et al*, 2000).

A determinação da estrutura da cistatina da clara de ovo de galinha revelou que os domínios inibitórios são compostos de cinco fitas antiparalelas em torno de uma α -hélice central. A estrutura da molécula toma a forma de cunha, que se encaixa no sítio de ligação ao substrato da papaína. A extremidade da cunha é formada pela região N-terminal parcialmente flexível contendo os resíduos de Gly-8 e Ala-10 e os dois *hairpin loops* característicos (BJORK e YLINENJARVI, 1989; HALL *et al*, 1993; GRZONKA *et al*, 2001).

O mecanismo de ação das cistatinas foi elucidado por diversos estudos cinéticos e cristalográficos. Esses estudos demonstraram que as cistatinas são inibidores que obstruem o acesso do substrato.

A determinação da estrutura tridimensional do complexo formado entre a estefina humana B e a papaína, permitiu a elucidação completa do mecanismo inibitório das cistatinas. Os dois *hairpin loops* típicos interagem com a superfície da enzima nos sítios de ligação S1' ao S4', enquanto a porção N-terminal da molécula de cistatina se posiciona ao longo dos subsítios S3 a S1 (figura 3).

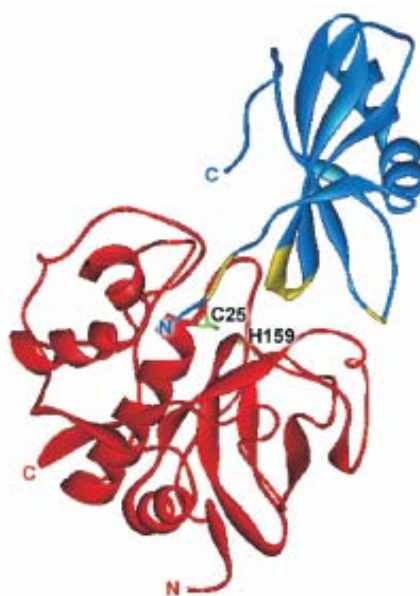


Figura 3. Estrutura 3D do complexo inibitório formado pela estefina B (inibidor) e pela papaína (enzima). O inibidor é mostrado em azul, a enzima, em vermelho. A localização

dos resíduos catalíticos Cys e His é mostrada em verde, regiões do inibidor importantes para a interação com a enzima, em amarelo. Fonte: RZYCHON *et al*, 2004.

Embora o inibidor se ligue de forma semelhante ao substrato, evitando a clivagem, a molécula de cistatina permanece intacta, mesmo após sua interação com a protease (STUBBS *et al*, 1990).

Estruturalmente, as cistatinas constituem uma única superfamília de proteínas relacionadas evolutivamente. Com base no número e seqüência de aminoácidos, quantidade de motivos cistatínicos, localização subcelular e número de ligações dissulfeto, esses inibidores têm sido classificados em três famílias de cistatinas animais, além de uma nova subfamília identificada em plantas, as fitocistatinas (BARRET, 1986 *apud* SADAF, 2005; RAWLINGS e BARRET, 1994).

As cistatinas pertencentes à família 1 são as estefinas. Consistem em polipeptídios normalmente citosólicos, de peso molecular de aproximadamente 11 kDa, formados por uma cadeia simples sem a presença de ligações dissulfeto e de carboidratos. Exemplos delas são as cistatinas humanas A e B (BARRET *et al*, 1986 *apud* SADAF, 2005).

A família 2 é a família das cistatinas propriamente ditas (cistatinas humanas C, D e S, entre outras). As proteínas dessa classe são polipeptídeos de 13 a 24 kDa formados por apenas uma cadeia de aminoácidos com duas ligações dissulfeto, mas sem a presença de sítios de glicosilação (ABRAHAMSON, 1993).

A família 3, dos cininogênios, é formada por glicoproteínas de 60 a 120 kDa, apresentando oito pontes dissulfeto e três domínios cistatínicos sucessivos, dos quais apenas o segundo e terceiro apresentam atividade inibitória (SALVESEN *et al*, 1986 *apud* ABRAHAMSON *et al*, 2003).

Finalmente, a família das fitocistatinas, que inclui quase todos os inibidores de cisteíno-proteases de plantas. Nos últimos anos, várias proteínas homólogas a cistatinas de

animais foram isoladas de plantas. Através do seqüenciamento de seus cDNAs correspondentes, observou-se que essas cistatinas não poderiam ser incluídas em nenhuma das três famílias conhecidas (ARAI *et al*, 2002). O tamanho e a seqüência das fitocistatinas são similares aos da família 2, variando entre 5 e 87 kDa, entretanto, não contém ligações dissulfeto nem resíduos de cisteína, assim como as estefinas (família 1). Além das três regiões conservadas comuns a todas as cistatinas, as fitocistatinas possuem uma seqüência conservada única LARF/YAV/IXXXN no N-terminal da hélice-R1 (MARGIS *et al*, 1998).

As fitocistatinas têm sido identificadas em uma variedade de plantas superiores como o arroz (ABE *et al*, 1987), milho (ABE *et al*, 1992), soja (HINES *et al*, 1991), cevada (JOSHII *et al*, 1998), gergelim (SHYU *et al*, 2004 a), etc. A cistatina do arroz, denominada Orizacistatina, foi a primeira cistatina bem definida de origem vegetal. Atua como inibidora de cisteíno-protease, possuindo uma ação potencial em enzimas-alvo exógenas, como proteases de insetos e fungos (ABE *et al*, 1987).

Essa subfamília de inibidores tem sido apontada como reguladoras endógenas de cisteíno-proteases, participando de várias atividades biológicas, como a mobilização de reservas durante a embriogênese e a germinação das sementes e nas respostas aos estresses bióticos e abióticos (ABE *et al*, 1987; CALLIS, 1995; PERNAS *et al*, 2002). Podem estar envolvidas também em mecanismos de defesa das plantas contra a invasão de patógenos como insetos e nematódeos, cujas cisteíno-proteases participam da replicação celular, ou do ataque de pragas, além de servirem como enzimas digestivas intestinais (ARAI *et al*, 2002). As fitocistatinas têm sido implicadas também na apoptose, modulando a atividade de cisteíno-proteases na regulação do *turnover* protéico (SOLOMON *et al*, 1999; BELENGHI *et al*, 2003). Além disso, têm sido usadas como suplementos no processamento de alimentos, dentre outras aplicações biotecnológicas (GUTIERREZ-CAMPOS *et al*, 1999).

1.3.1.1.1 – CISTATINAS DA CANA-DE-AÇÚCAR

Na cana-de-açúcar, a primeira descrição das cistatinas foi feita por MARGIS e REIS em 2001, que identificaram, no banco de dados do SUCEST (*Sugarcane ESTs Project*), 25 prováveis cistatinas. Dessas 25 seqüências, o clone identificado como SCCCRZ2001G09 foi caracterizado em nosso laboratório por SOARES-COSTA *et al* em 2002.

Após seqüenciamento e alinhamento desse clone com outras fitocistatinas anteriormente caracterizadas, como a Orizacistatina, confirmou-se que se tratava realmente de uma proteína inibidora de cisteíno-protease, sendo denominada de Canacistatina. O gene da Canacistatina codifica para uma proteína de aproximadamente 14 kDa, a qual apresenta regiões conservadas comuns às cistatinas, como o motivo QXVXG, envolvido na interação com o sítio ativo de proteases.

A expressão dessa proteína na forma recombinante, em um sistema bacteriano, permitiu a predição de sua estrutura secundária, por meio de dicroísmo circular, apresentando estrutura secundária similar à proteína Orizacistatina I (SOARES-COSTA, 2004).

A proteína purificada também foi utilizada em testes que resultaram na inibição da atividade das proteases papaína, cruzaína e baupaína, além de inibir catepsinas humanas como as catepsinas L, K, V e B (OLIVA *et al*, 2004).

Mais recentemente, GIANOTTI *et al* (2006) identificaram duas novas cistatinas da cana-de-açúcar, também a partir dos bancos de dados do SUCEST, usando na busca a seqüência de aminoácidos da proteína Canacistatina. Nesse estudo, essas proteínas, provisoriamente denominadas CaneCPI2 e CaneCPI3, tiveram suas seqüências comparadas com a

Canacistatina e a Orizacistatina I, demonstrando a presença de domínios cistatínicos conservados, além de domínios específicos de fitocistatinas.

Da mesma forma que a Canacistatina, as proteínas CaneCPI2 e CaneCPI3 recombinantes foram produzidas por expressão em *E. coli*. As duas proteínas purificadas foram usadas para produzir anticorpos que permitiram identificar, por meio de imunodeteção, essas cistatinas em extratos protéicos de folha, meristema e raiz de cana-de-açúcar.

Os ensaios de inibição utilizando as duas novas cistatinas de cana revelaram que essas proteínas são capazes de inibir a ação da papaína, confirmando, mais uma vez, que se tratam de cistatinas.

Além desses clones, existem diversos outros que também apresentam alta similaridade com as seqüências de aminoácidos da Canacistatina e da Orizacistatina, porém, suas caracterizações ainda não foram realizadas.

Devido a essa intensa caracterização e à facilidade de purificação da Canacistatina em sistema bacteriano, essa proteína foi considerada um modelo adequado para implementação e melhor conhecimento do sistema de expressão baculovírus/células de inseto no Laboratório de Biologia Molecular da UFSCar.

1.4 – CÉLULAS DE INSETO: UMA ALTERNATIVA PARA A PRODUÇÃO DE CANACISTATINA RECOMBINANTE

As proteínas de interesse biotecnológico, como a Canacistatina, vêm atraindo a atenção de pesquisadores, havendo grande aumento no número de pesquisas relacionadas ao estudo dessas proteínas. Isto tem levado à purificação de milhares de proteínas, elucidação

da estrutura e mecanismo químico de muitas delas e entendimento geral de como trabalham e como são reguladas (LEHNINGER *et al*, 2002).

Muitas vezes, o baixo rendimento de algumas proteínas extraídas diretamente dos organismos que a produzem, bem como a necessidade de se obter proteínas somente encontradas em organismos patogênicos ou perigosos, tais como parasitas de humanos ou animais, torna esses estudos um processo difícil.

Diante disto, a produção e caracterização de proteínas tem sido bastante facilitadas pelo desenvolvimento de sistemas para expressão de proteínas em células heterólogas. Nesse contexto, o sistema baculovírus/células de inseto tem se mostrado eficaz para produzir grandes quantidades de proteínas funcionais, uma vez que a maioria das modificações pós-traducionais realizadas em células de inseto são idênticas às que ocorrem em mamíferos. Com isso, as proteínas produzidas em células de inseto frequentemente são mais similares a suas equivalentes eucarióticas do que as proteínas produzidas em bactérias (MANSOTTE *et al*, 1995; OLCZAK e OLCZAK, 2005).

Várias características desse sistema são particularmente vantajosas. Dentre elas, talvez a mais importante seja a capacidade do sistema de expressão baculovírus/células de inseto fornecer um ambiente eucariótico que geralmente contribui de forma adequada para o enovelamento, formação de ligações dissulfeto, e/ou outras modificações pós-traducionais necessárias para a atividade biológica de algumas proteínas eucarióticas. As modificações pós-traducionais que têm sido relatadas em células de inseto infectadas por baculovírus incluem a remoção de seqüências-sinal, clivagem proteolítica, N-glicosilação, O-glicosilação, acilação, amidação, fosforilação, prenilação e carboximetilação e ocorrem normalmente em sítios posicionados de forma idêntica nas proteínas produzidas em células de mamíferos e insetos (O'REILLY *et al*, 1994).

Os baculovírus compreendem o maior grupo de vírus que infectam insetos. Além de um grande potencial como agentes de controle biológico de insetos-praga em agricultura e áreas florestais, mais recentemente, os baculovírus têm sido largamente utilizados como vetores de expressão. Nesse caso, vêm sendo bastante utilizado na medicina para a produção de agentes terapêuticos profiláticos (vacinas) e para diagnose, além de contribuir para a produção de inseticidas virais geneticamente modificados.

Atualmente, o baculovírus mais estudado é o Nucleopoliedrovírus de *Autographa californica* (AcNPV), causador da poliedrose nuclear múltipla, condição caracterizada pelo acúmulo de múltiplas estruturas poliédricas no núcleo das células de inseto. Essas estruturas são compostas quase que exclusivamente pela proteína poliedrina. Esse vírus apresenta uma grande amplitude de hospedeiros, infectando mais de 25 espécies de insetos, entre eles as lagartas da mariposa *Spodoptera frugiperda* (Figura 4) (CASTRO *et al*, 1999).

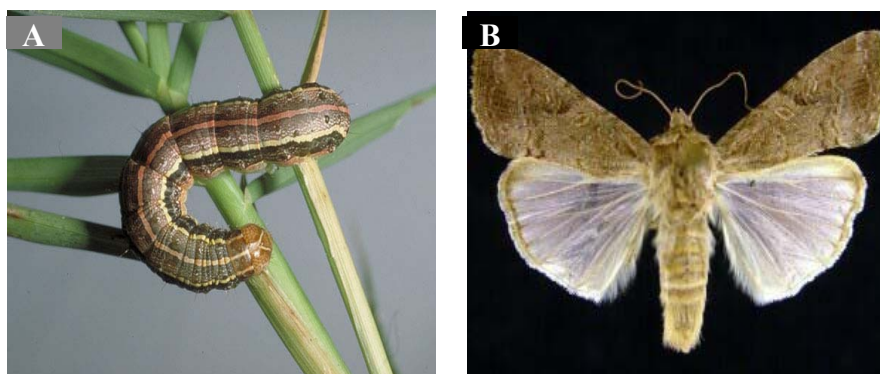


Figura 4. Inseto *Spodoptera frugiperda* em diferentes estágios do ciclo de vida: (A) Lagarta (Fonte: <http://insects.tamu.edu/extension/youth/bug/bug102.html>) e (B) inseto adulto (Fonte: <http://mothphotographersgroup.msstate.edu/Files/JV/JV50.7.shtml>).

O genoma dos baculovírus é composto por um DNA circular de fita dupla, variando de 80 a 200 kb, envolto por um capsídeo protéico em forma de bastonete (40 a 50 nm de

largura por 200 a 400 nm de comprimento). Essa estrutura constitui o nucleocapsídeo, unidade infectiva do vírus (O'REILLY *et al*, 1994).

Durante o ciclo de vida dos baculovírus, os vírions podem assumir duas formas fenotipicamente distintas: os *Budded virus* (BV) e os *Occluded virus* (OV). Os BV brotam da membrana plasmática da célula hospedeira para o meio extracelular, com estruturas denominadas peplômeros, sendo envelopados individualmente (figura 5A); e os *Occluded virus* (OV), que adquirem a membrana dentro do núcleo e são ocluídos dentro de matrizes protéicas cristalinas, denominadas corpos de oclusão poliédricos (figura 5B). Corpos de oclusão contendo um (SNPV – *Single Nuclear Polyhedrosis Virus*) ou vários vírions (MNPV – *Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus*) da poliedrose nuclear são constituídos principalmente pela proteína poliedrina.

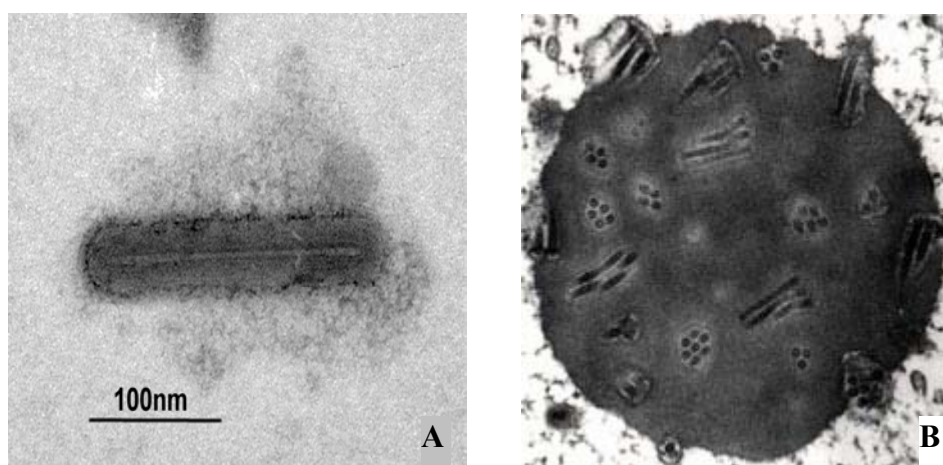


Figura 5. Formas virais do vírus da nucleopoliedrose. (A) Baculovírus do tipo *Budded virus* envelopado individualmente (Fonte: <http://www.mardre.com/homepage/mic/tem/samples/bio/virus/bac2.htm>) e (B) Corpo de oclusão mostrando diversos vírions de baculovírus dentro da matriz cristalina da proteína poliedrina (Fonte: <http://www.ent.iastate.edu/dept/faculty/bonningb/research.html>).

As duas formas virais são genotipicamente idênticas, mas desempenham papéis distintos no ciclo infectivo do vírus. A forma ocluída (OV) é responsável pela transmissão de inseto para inseto. Já a forma não ocluída do vírus (BV) é responsável pela transmissão de célula a célula, em um mesmo indivíduo (infecção sistêmica), devido à presença dos peplômeros, compostos principalmente pela fosfoglicoproteína gp64, que é essencial na infectividade dos vírus (CASTRO *et al*, 1999).

Os *occluded virus* (OV), ao infectar lagartas de *S. frugiperda*, por exemplo, se multiplicam com grande intensidade e se espalham por diversos tecidos na forma de BV e, em pouco tempo, provocam a morte da lagarta infectada. A lagarta morta se torna inchada, repleta de corpos de oclusão poliédricos (contendo partículas virais) e constituído, predominantemente, da proteína poliedrina. Essa proteína, apesar de abundante, não é essencial para a replicação dos vírus, atuando, exclusivamente, na proteção dos vírus (OV) liberados na natureza.

Com base nessas observações, foi desenvolvido o sistema de expressão de proteínas recombinantes em células de inseto. Nesse sistema, o gene que codifica a proteína poliedrina é substituído por um outro gene, que codifica a proteína de interesse. Dessa forma, a nova seqüência passa a ser controlada pelo promotor da poliedrina, capaz de produzir altos níveis de proteína (MONTOR E SOGAYAR, 2003).

Para utilização deste processo *in vitro*, foram estabelecidas culturas de células de inseto utilizando, por exemplo, células epiteliais do ovário de *S. frugiperda*, comercialmente conhecidas como Sf9 ou Sf21, células-ovo da lagarta *Trichoplusia nii*, conhecidas como *Hi Five*, entre outras. Essas células, em cultura, são infectadas pelos baculovírus contendo o gene de interesse sob o controle do promotor da poliedrina, os quais utilizam a maquinaria celular para a produção da proteína de interesse, de forma semelhante às infecções virais que ocorrem na natureza.

Em cultura de células, o ciclo da infecção ocorre em três fases: a fase inicial, a fase tardia e a fase muito tardia. A fase inicial, que ocorre durante as primeiras seis horas após a infecção, corresponde biologicamente à fase de reprogramação da célula para a replicação do vírus e se inicia logo após a entrada do vírus na forma de BV, por endocitose adsorptiva. Após a entrada do vírus, os nucleocapsídeos se dirigem para o núcleo, onde é decapsidado e o DNA é liberado. A transcrição do DNA viral se inicia imediatamente, podendo-se detectar a presença de RNA viral 30 minutos após a infecção. Nessa fase, começam a surgir os primeiros efeitos citopáticos.

A fase seguinte, chamada de fase tardia, ocorre entre seis e 24 horas após a infecção, e é caracterizada por uma intensa replicação de DNA viral, expressão de genes tardios e produção de BV. Os nucleocapsídeos com peplômeros migram do núcleo até a membrana citoplasmática, de onde brotam individualmente, sendo liberados no meio de cultura.

Na fase muito tardia, que ocorre após 24 horas de infecção, são produzidos os OV. Durante o processo de oclusão, os nucleocapsídeos interagem com segmentos de envelope de membrana elaborados dentro do núcleo e, eventualmente, se tornam envelopados, ou individualmente (SNPV) ou em grupos (MNPV). Nessa fase, há uma intensa produção da proteína poliedrina até 72 horas após a infecção, a qual forma uma matriz protéica que envolve vários SNPV e MNPV dentro de corpo de oclusão (poliedros). À medida que a infecção progride, esses poliedros se acumulam dentro do núcleo, comprimindo o citoplasma (MONTOR E SOGAYAR, 2003; O'REILLY *et al*, 1994).

Nesse trabalho, o gene que codifica para a proteína Canacistatina foi colocado sob o controle do promotor da poliedrina, para a produção da proteína de interesse em células Sf9. Embora a Canacistatina tenha sido anteriormente produzida em sistema de expressão bacteriano, sua expressão em células de inseto é uma abordagem interessante por se tratar de um sistema eucariótico e, portanto, mais semelhante ao organismo de origem da proteí-

na nativa. Com isso, um dos objetivos desse estudo é verificar as diferenças quanto ao rendimento e custo-benefício da produção da proteína canacistatina em ambos os sistemas, bem como se a proteína produzida em células de inseto apresenta variação quanto à atividade, devido às diferenças no processamento apresentadas pelos dois sistemas.

2 – OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve, como principal objetivo, o estabelecimento da metodologia de expressão heteróloga de proteínas, utilizando o sistema de expressão Baculovírus/Células de Inseto, no Laboratório de Biologia Molecular da UFSCar. Além disso, este trabalho foi utilizado como base para a caracterização cinética e fisiológica deste sistema, realizado no Laboratório de Tecnologia de Cultivo Celular (LATECC), do Deptº. de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela estudante de Mestrado do Programa de Biotecnologia Mabel Karina Arantes. Para tanto, utilizou-se a proteína Canacistatina como modelo de estudo, uma vez que a mesma já foi bem caracterizada no próprio laboratório por meio do sistema bacteriano de expressão. Além disso, a proteína expressa foi caracterizada quanto à sua estabilidade em diferentes temperaturas e pHs, o que ainda não havia sido realizado para a proteína expressa em bactérias.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Subclonagem da ORF da Canacistatina no vetor de transferência pFastBac HT B;
- ❖ Obtenção de DNA bacmial recombinante;
- ❖ Transfecção do DNA bacmial recombinante para a obtenção de partículas virais contendo o gene de interesse;
- ❖ Expressão heteróloga da proteína Canacistatina em sistema baculovírus/células de inseto;
- ❖ Purificação da proteína Canacistatina;
- ❖ Teste de inibição da proteína Canacistatina contra a cisteíno-protease papaína;
- ❖ Determinação da estabilidade da Canacistatina em diferentes condições de temperatu-

ra e pH.

3– MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

O cDNA que codifica a proteína de interesse utilizado nesse trabalho foi retirado do vetor de expressão pET28a-Canacistatina proveniente do trabalho de Doutorado de Andréa Soares da Costa (SOARES-COSTA, 2004), realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos-SP.

Para os experimentos de clonagem e expressão foi utilizado o Kit Bac-to-Bac® *Baculovirus Expression System* comercializado pela Invitrogen, o qual contém os vetores de transferência pFastBac™ (sendo que o vetor utilizado nesse trabalho foi o pFastBac HT B), as células *E. coli* competentes MAX Efficiency® DH10Bac™ e o reagente lipossomal Cellfectin®.

Na etapa de clonagem, foram utilizadas também bactérias *E. coli* competentes da cepa DH5α (NOVAGEN). Para a expressão da proteína foram utilizadas células de inseto da linhagem Sf9 gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Cláudio A. T. Suazo, do LATECC – UFSCar. Na fase de purificação, foi utilizada a resina de níquel Ni-NTA Superflow da QIAGEN. Para os ensaios de atividade, a enzima utilizada foi a cisteíno-protease papaína, o substrato foi o Z-FR-MCA e o ativador enzimático, o 1,4-Dithioerythritol (DTE), todos da SIGMA.

A maioria dos reagentes utilizados para o preparo de soluções durante o trabalho foi da marca Merck (grau analítico P.A.). Os marcadores de peso molecular utilizados foram o *GeneRuler 1Kb DNA Ladder* (Fermentas) e o *Bench Mark Protein Ladder* (Invitrogen). Os antibióticos utilizados foram Tetraciclina (Merck), Ampicilina (USB), Kanamicicina (GIBCO) e Gentamicina (Invitrogen). O IPTG e o X-GAL, das marcas Invitrogen e USB,

respectivamente. Os meios de cultura LB (*Luria-Bertani*) líquido e ágar foram da marca USB e os meios de cultura para células de inseto Grace não-suplementado e Sf900 II SFM, da Invitrogen.

A enzima *Taq* DNA Polimerase utilizada foi da marca Fermentas, as enzimas de restrição *Nco* I e *Hind* III foram obtidas do fabricante Fermentas e a enzima T4 DNA Ligase e seu respectivo tampão foram obtidos da USB. Os oligonucleotídeos específicos para o gene Canacistatina e os *primers* M13 foram sintetizados pela IDT (Prodimol, Brasil).

3.2 – MÉTODOS

3.2.1 – Isolamento da ORF da Canacistatina

A ORF (*Open Reading Frame*) da Canacistatina foi isolada a partir do vetor pET28a-Canacistatina (SOARES-COSTA, 2004) por meio de amplificação através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando *primers* específicos para o gene de interesse. Esses *primers* continham, em suas seqüências, sítios para as enzimas *Nco* I (sublinhado) (*Forward*: 5' - CCATGGCCGAGGCACACAACGGG - 3') e *Hind* III (sublinhado) (*Reverse*: 5' - AAGCTTGGCGTCCCCGACCGGCT - 3').

A mistura de reação utilizada para a amplificação continha 20 ng do DNA molde pET28a-Canacistatina, uma unidade da enzima *Taq* DNA Polimerase, 3 mM de Cloreto de Magnésio, 0,2 mM de dNTP's, tampão da enzima 1X e 5 pmoles de cada *primer*, num volume final de reação de 100 µl. A reação de amplificação foi feita em termociclador PTC-100TM – MJ Research, INC., submetida a uma temperatura inicial de 94°C durante 2 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94°C), anelamento (30 segundos

a 55°C) e extensão (1 minuto a 72°C), mais um passo adicional de extensão a 72°C por 5 minutos.

O produto de amplificação foi analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. O amplificado foi purificado utilizando-se o kit GFX PCR – *DNA and gel band purification kit* (Amersham) e quantificado em gel de agarose 1% por comparação com o *GeneRuler 1Kb DNA Ladder* (Fermentas).

3.2.2 – Subclonagem do gene Canacistatina no vetor de expressão

O produto da amplificação purificado e o DNA do vetor pFastBac HT B (Invitrogen) foram clivados com as enzimas *Nco* I e *Hind* III, a 37°C durante 2 horas.

Após a clivagem, os produtos foram aplicados em gel de agarose 1% e os fragmentos de interesse foram isolados do gel utilizando-se novamente, o kit GFX PCR. Em seguida, os fragmentos purificados foram utilizados em uma reação de ligação, *overnight* a 4°C, contendo 100 ng do vetor de expressão pFast Bac HT B e 100 ng do cDNA da Canacistatina.

As reações de ligação foram então utilizadas para transformar células *E. coli* DH5 α quimicamente competentes, por meio da metodologia de transformação por choque térmico descrita por SAMBROOK e RUSSEL (2001).

As células transformadas foram cultivadas em meio seletivo (LB Ágar) contendo o antibiótico Ampicilina (100 μ g/ml). Dentre essas células transformadas, foram selecionadas aquelas que continham os plasmídeos recombinantes, por meio de PCR de colônia. Para essa reação, o DNA molde foi obtido através da coleta de 10 colônias e ressuspensão das mesmas em diferentes tubos *Eppendorf* contendo 30 μ l de H₂O. As colônias diluídas

foram fervidas durante 5 minutos para permitir a lise das bactérias e conseqüente liberação do DNA. A PCR de colônias foi feita utilizando-se 5 µl das colônias fervidas como molde e os *primers* do gene Canacistatina, de forma semelhante à reação de isolamento do gene a partir do pET28a.

A partir das colônias positivas contendo os plasmídeos recombinantes, denominados de pBAC-CaneCPI, foram realizadas mini-preparações para isolar os DNAs plasmidiais recombinantes utilizando-se o Kit de extração de DNA plasmidial *Wizard® Plus SV Mini-preps – DNA Purification System* (PROMEGA). Os plasmídeos recombinantes isolados foram seqüenciados para confirmação da integridade da seqüência do fragmento inserido, através do método dideoxi (SANGER *et al*, 1977) em Seqüenciador automático ABI Prism 377, utilizando-se os *primers* da Canacistatina individualmente.

O vetor de expressão pFastBac HT B é um vetor de fusão que contem uma cauda de histidina (6xHis) N-terminal, o que facilita a posterior purificação da proteína recombinante de interesse. Além disso, a expressão do gene de interesse é controlada pelo promotor da poliedrina (PH) do vírus da Poliedrose Nuclear Múltipla de *Autographa californica* (AcMNPV), um promotor que permite altos níveis de expressão protéica em células de inseto.

O cassete de expressão do plasmídeo de pFastBac HT B é flanqueado pelos elementos de transposição mini-Tn7 (Tn7R e Tn7L) que permitem uma transposição sítio-específica do gene de interesse no genoma do baculovírus presente nas células *E. coli* competentes MAX Efficiency® DH10Bac™. O mapa do vetor de expressão e o sítio de clonagem múltipla são ilustrados na figuras 6 e 7, respectivamente.

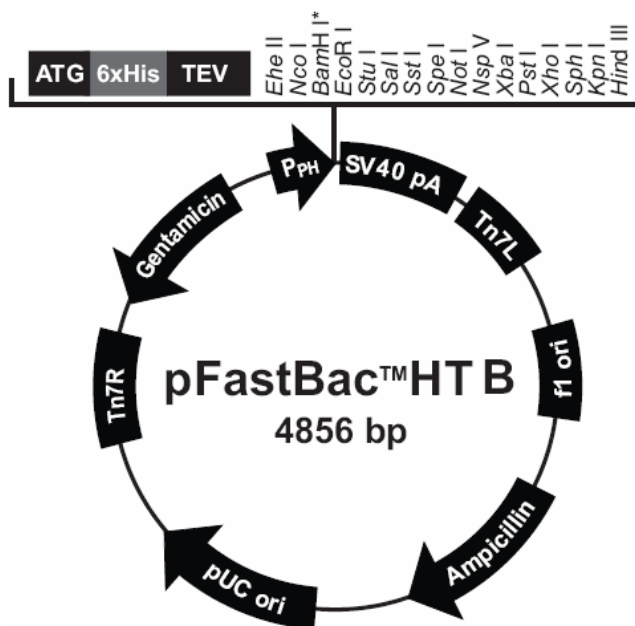


Figura 6. Mapa do vetor de expressão pFastBac HT B, no qual é possível observar o sítio de clonagem múltipla. Fonte: Manual Bac-to-Bac *Baculovirus Expression System* (Invitrogen), 2004.

				6xHis tag										
4050	ATG	TCG	TAC	TAC	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	GAT	TAC	GAT	ATC
	Met	Ser	Tyr	Tyr	His	His	His	His	His	His	Asp	Tyr	Asp	Ile
					TEV recognition site									
											Ehe I	Nco I	Bam H I	
4092	CCA	ACG	ACC	GAA	AAC	CTG	TAT	TTT	CAG	GGC	GCC	ATG	GGA	TCC
	Pro	Thr	Thr	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln	Gly	Ala	Met	Gly	Ser
												▲		
4134	GGA	ATT	CAA	AGG	CCT	ACG	TCG	ACG	AGC	TCA	CTA	GTC	GCG	GCC
	Gly	Ile	Glu	Arg	Pro	Thr	Ser	Thr	Ser	Ser	Leu	Val	Ala	Ala
4176	GCT	TTC	GAA	TCT	AGA	GCC	TGC	AGT	CTC	GAG	GCA	TGC	GGT	ACC
	Ala	Phe	Glu	Ser	Arg	Ala	Cys	Ser	Leu	Glu	Ala	Cys	Gly	Thr
4218	AAG	CTT	GTC	GAG	AAG	TAC	TAG	AG	SV40 polyadenylation signal					
	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Tyr	***							

Figura 7. Sítio de múltipla clonagem do vetor pFastBac HT B. O códon de iniciação ATG é indicado em negrito e os sítios de restrição são marcados para indicar o sítio de clivagem efetivo. Fonte: Manual Bac-to-Bac *Baculovirus Expression System* (Invitrogen), 2004.

3.2.3 –Construção dos bacmídeos recombinantes

Uma vez gerados, purificados e seqüenciados, o plasmídeo recombinante pBAC-CaneCPI foi utilizado para transformar as células *E. coli* competentes MAX Efficiency® DH10Bac™. Essas células competentes contêm, além do próprio genoma, o bacmídeo (genoma do baculovírus com 136 kb) e um plasmídeo auxiliar (13,2 kb) que codifica para uma transposase (figura 8).

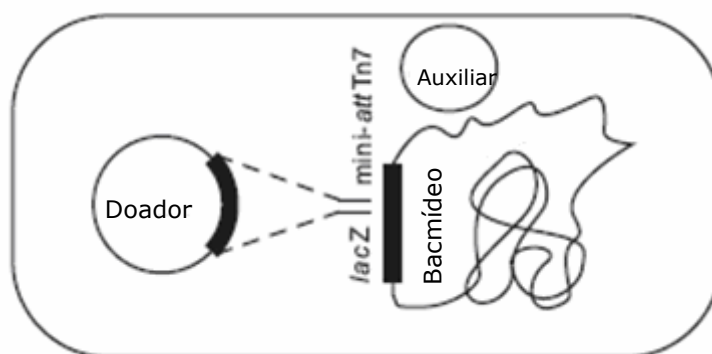


Figura 8. Esquema ilustrativo da célula competente DH10Bac, indicando a transposição do cassete de expressão do plasmídeo doador para a região receptora do genoma bacmídial.
Fonte: Manual Bac-to-Bac *Baculovirus Expression System* (Invitrogen), 2004.

O bacmídeo apresenta sítios receptores de transposição *mini-attTn7*, situados de modo que o fragmento transposto fique sob o controle da poliedrina. Além disso, esses sítios se localizam dentro do gene *lacZ*, o que permite identificar os clones dos bacmídeos recombinantes por meio da utilização do substrato cromogênico X-gal e do indutor, IPTG.

Para esse procedimento, 100 µl de células DH10Bac competentes foram transferidas para um tubo Falcon de 15 ml pré-resfriado, ao qual foi adicionado 1 ng do DNA plasmí-

dial recombinante pBAC-CaneCPI e misturado gentilmente. As células foram incubadas no gelo durante 30 minutos e, em seguida, mantidas durante 45 segundos a 42°C, para o choque-térmico. O tubo contendo as células foi imediatamente transferido para o gelo e resfriado por dois minutos. Em seguida, adicionou-se 900 µl de meio S.O.C. à temperatura ambiente e incubou-se as células a 37°C, com agitação de aproximadamente 225 rpm por 4 horas.

A partir das células transformadas foram feitas diluições seriadas de 10 vezes (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) com meio S.O.C. e foram cultivadas em meio LB ágar contendo os antibióticos kanamicina 50µg/ml, gentamicina 7µg/ml e tetraciclina 10µg/ml, bem como IPTG (40 µg/ml) e X-gal (100 µg/ml) por 48 horas a 37°C.

Para confirmar a ocorrência das transposições, foram selecionadas 10 colônias de cor branca, as quais foram utilizadas como DNA molde para reações de PCR. Nesse caso, as reações foram realizadas com a utilização dos *primers* M13 *forward* (5'-GTTTCCAGTCACGAC-3') e M13 *reverse* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') e as combinações do *primer* M13 *forward* com o *primer* específico da Canacistatina *reverse* e M13 *reverse* com o *primer* específico da Canacistatina *forward*.

Após confirmação das transposições via PCR, os DNAs bacmidiais recombinantes foram isolados por midi-preparação de DNA utilizando-se o *Plasmid Midi Kit* (QIAGEN).

3.2.4 – Transfecção das células de inseto

As células de inseto Sf9 utilizadas nos experimentos de transfecção e, posteriormente, nos experimentos de infecção foram previamente criopreservadas em nitrogênio líquido

a -196°C , em meio de congelamento contendo SF900 II SFM, 7,5% de DMSO (dimetilsulfoxido) e 50% de Soro Fetal Bovino, na concentração aproximada de $1,5 \times 10^6$ cel/ml.

Para reativação, as células foram descongeladas a temperatura ambiente e, posteriormente, adicionadas a 4 mL de meio de cultura Sf900 II SFM. Em seguida, as células foram centrifugadas a $1000 \times g$ durante 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células, ressuspendidas em 5 mL de meio Sf900 II SFM em garrafa de cultura de células de 25 cm^2 e incubadas a 28°C por 72 horas. Após esse período, as células foram desadheridas e coletadas para determinação da concentração celular pelo método de exclusão por corante Azul de Tripán, em Hemacitômetro (Câmara de Newbawer).

Este método baseia-se na permeabilidade das células mortas ao corante, de modo que células azuis são contadas como mortas. Para isso, as células coletadas foram diluídas 10 vezes, adicionando-se $160 \mu\text{l}$ de solução PBS 1X e $20 \mu\text{l}$ de células e $20 \mu\text{l}$ do corante Azul de Tripán 0,04%, e colocadas no hemacitômetro. A contagem foi realizada em 8 quadrantes (uma câmara), em microscópio de fase invertida, considerando-se as células vivas e mortas, separadamente. A média de células vivas e mortas foi multiplicada por um fator de 10^4 células/ml, correspondente ao número de células contidas no volume da câmara de Newbauer, e por um fator de 10^1 , correspondente à diluição utilizada (10 vezes). obtendo-se assim a concentração celular em células/mL.

Para o cálculo porcentagem da viabilidade, o número de células viáveis foi dividido pelo número de células totais e multiplicado por cem.

Após a contagem, as 2×10^7 células foram inoculadas em meio Sf900 II SFM, num volume de trabalho de 20 ml ($C=1 \times 10^6$ cel/mL). As células foram cultivadas em suspensão, em garrafa Schott de 100mL, em mesa incubadora rotativa (*Shaker*) a 100 rpm, 27°C . As células utilizadas em todos os experimentos foram retiradas na metade da fase exponencial de crescimento (aproximadamente 4×10^6 céls/ml) com aproximadamente 97% de viabili-

dade. Para cultivos em meio SF900 II, a fase exponencial de crescimento cessa quando a concentração celular é próxima de 9×10^6 cel/ml, portanto a metade da fase exponencial se dá nas concentrações próximas de 4×10^6 cel/ml. O cultivo deve ser mantido em fase exponencial de crescimento, portanto os repiques devem ser realizados neste período.

Todos os experimentos utilizando cultivo de células de inseto foram realizados em conjunto com a estudante de Mestrado do Programa de Biotecnologia Mabel Karina Arantes, do Laboratório Tecnologia de Cultivo Celular, do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (ARANTES, 2007).

Após a obtenção dos bacmídeos recombinantes purificados e da preparação das células Sf9, foram realizados os experimentos de transfecção. Em uma placa de cultura de tecidos de 6 poços, foram semeadas 9×10^5 células por poço em 2 ml de meio Sf900 II SFM contendo penicilina (50 unidades/ml) e estreptomicina (50 $\mu\text{g/ml}$). As células foram incubadas a 27°C por aproximadamente 1 hora, ou até que atingissem aproximadamente 70% de confluência (adesão ao fundo da placa verificada visualmente).

Durante o período de incubação das células, preparou-se o complexo DNA bacmidial:Cellfectin® (Invitrogen) em tubos *Eppendorf* de 1,5 ml. Para tanto, diluiu-se, separadamente, 6 μg de DNA bacmidial em 600 μl de Meio Grace (Invitrogen) não-suplementado e 36 μl de Cellfectin® (misturar antes invertendo o tubo 5 a 10 vezes) em 600 μl de Meio Grace não-suplementado. Combinou-se o DNA bacmidial diluído com o Cellfectin® diluído (volume total de aproximadamente 1,25 ml) e misturou-se gentilmente. A mistura foi transferida para um tubo Falcon de 15 ml e incubada por 15 a 45 minutos a temperatura ambiente.

Durante a incubação do complexo, removeu-se o meio de cultura das células, as quais foram lavadas com 2 ml de Meio Grace não-suplementado e o meio foi removido. Adicionou-se 4,8 ml do Meio Grace não suplementado ao tubo contendo o complexo DNA bac-

midial:Cellfectin®, misturou-se gentilmente e adicionaram-se 2 ml do complexo diluído a cada poço da placa contendo as células. As células foram incubadas a 27°C por 5 horas. Depois desse período, o complexo DNA:Cellfectin foi removido com o auxílio de uma pipeta, com cuidado para não desaderir as células, e 2 ml de meio Sf900 II SFM (contendo os antibióticos nas concentrações anteriormente citadas) foram adicionados às células. As células foram então incubadas em incubadora a 27°C por sete dias.

Passado o período de incubação adequado, o estoque baculoviral foi obtido coletando-se o sobrenadante da cultura infectada por meio de centrifugação e estocado a 4°C protegido da luz. Esse estoque foi denominado estoque viral P1.

Posteriormente, para obter um título viral mais alto, foi realizada uma amplificação do estoque viral P1. Adicionou-se 1 ml do estoque P1 a 4 ml de células Sf9, num total de 1 milhão de células. Incubaram-se as células infectadas a 27°C durante sete dias e, passado esse tempo, o sobrenadante foi coletado por centrifugação a 500 x g por cinco minutos. Esse estoque foi denominado estoque viral P2 e armazenado a 4°C, protegido da luz.

3.2.5 – Determinação do Título Viral por *End-Point Dilution*

Para determinação do título viral do estoque viral P2, células Sf9 previamente cultivadas foram diluídas com meio de cultura Sf900 II SFM para uma concentração de 1×10^5 céls/ml. Os estoques virais a serem titulados foram preparados em diluições seriadas de 10^5 a 10^{-8} em um volume final de 200 µl com meio de cultura Sf900 II SFM. Alíquotas de 10 µl de cada diluição viral foram misturadas a alíquotas de 100 µl da suspensão de células e cada uma das diluições foi semeada em uma linha de uma placa de 96 poços, deixando um

poço de cada linha livre para ser utilizado como controle, ao qual foram adicionadas somente células não infectadas.

A placa contendo as células infectadas foi incubada em estufa a 27°C, durante sete dias. Ao final desse período, cada um dos poços foi analisado ao microscópio de luz invertida para verificar a replicação viral. Todos os poços em que foram detectados sinais de infecção, principalmente lise celular, foram considerados como positivos. A partir desses resultados, foi possível determinar o título do estoque viral P2, com o auxílio da planilha do *Excel* para cálculo do TCID₅₀ pelo método de Reed e Muench (1938) (O'REILLY *et al*, 1994), cujo modelo está apresentado no anexo 1.

3.2.6 – Extração de DNA de BV

Para confirmar se os vírus produzidos pelas infecções sucessivas continham o gene de interesse, foi realizada uma extração de DNA a partir do estoque viral P2, através do Método Miniprep para extração de DNA de BV (O'REILLY *et al*, 1994). Nesse método, 3 ml do estoque viral P2 foram centrifugados em microcentrífuga a 1000 x g durante 3 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o *pellet* descartado. Em seguida, o sobrenadante foi novamente centrifugado a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. Nessa segunda centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet*, ressuspensionado cuidadosamente em 100 µl de tampão de lise de vírus (Tris-HCl 1mM pH 7,6, EDTA 10 mM, SDS 0,25%). Adicionou-se proteinase K (20 µg/ml) para uma concentração final de 500 µg/ml e incubou-se a amostra durante duas horas a 50°C. Depois da incubação, o DNA viral foi purificado utilizando-se fenol-clorofórmio, como descrito por SAMBROOK e RUSSEL (2001). 20 ng do DNA extraído foram utilizados como molde em uma reação de amplificação uti-

lizando os *primers* específicos para o gene da canacistatina, como descrito anteriormente, de forma a confirmar a transposição.

3.2.7 – Extração de RNA das Células de Inseto

Para confirmar se as células de inseto permaneciam funcionais e utilizando sua maquinaria para permitir a transcrição e posterior tradução do gene de interesse, foi feita uma extração de RNA de células de inseto com o Reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

O RNA foi utilizado como molde para a síntese de cDNA por meio de uma reação de RT-PCR, utilizando o kit Inprom II (Subscript) (PROMEGA), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, 4 µl do cDNA foram utilizados em uma reação de amplificação com os *primers* da Canacistatina, como descrito anteriormente.

3.2.8 – Expressão da proteína Canacistatina recombinante em células de inseto

Depois de gerados os estoques baculovirais com um título adequado e confirmada a transposição, células Sf9 foram infectadas com o estoque viral P2 (título = 3×10^8 pfu/ml) para induzir a expressão da proteína de interesse.

Para tanto, um total de 4×10^7 células Sf9 foram diluídas em meio Sf900 II SFM, num volume final de 20 ml, em garrafa Schott de 100 mL. As células foram infectadas com 650 µL de estoque viral P2 (MOI=5,0) e incubadas em mesa incubadora rotativa (*Shaker*) a 100 rpm, 27°C por 96 horas (ARANTES, 2007).

Passado esse tempo, as células foram coletadas por centrifugação a 1000 x g durante 5 minutos em rotor SS-34, em centrífuga Sorvall. O sobrenadante foi descartado e o extrato celular foi ressuspensionado em tampão de lise (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM; pH 8,0) com a adição de Nonidet P-40 1% (SIGMA). A mistura foi mantida durante 10 minutos no gelo, sonicada por 40 segundos a 60 Hz e centrifugada novamente durante 30 minutos a 18000 x g em rotor SS-34, em centrífuga Sorvall para separar o sobrenadante e o extrato celular (ZHANG *et al*, 2006; The QIAexpressionist (QIAGEN), 2003). Alíquotas das duas frações foram analisadas em SDS-PAGE 15% (LAEMMLI, 1970), para confirmar a presença da proteína no sobrenadante.

Para confirmar a expressão da proteína de interesse, foi feito um ensaio de *Western blot* utilizando-se o anticorpo policlonal anti-Canacistatina (SOARES-COSTA, 2004). Para isso, as mesmas amostras utilizadas no ensaio de expressão foram submetidas novamente a SDS-PAGE 15%. Após a corrida, o gel de poliacrilamida foi colocado em contato com a membrana de nitrocelulose (Invitrogen), embebidos em tampão de transferência (Tris 200mM, glicina 50mM). Montar a estrutura para a transferência e coloca-la em um aparato de transferência (Cuba de eletroforese Mini V8 – GIBCO BRL – Life Technologies) e submetidos à voltagem de 150V, 160 mA, durante 1,5 horas, para permitir a transferência das proteínas contidas no gel para a membrana de nitrocelulose.

Terminada a transferência, a membrana foi corada durante 5 minutos em solução de Ponceau (Ponceau 0,5%, ácido acético 0,1%), para identificação das bandas de interesse. Em seguida a membrana foi incubada em solução de bloqueio 5% (leite em pó desnatado diluído em TBS 1X) a 4°C durante 16 horas. Depois deste tempo, a membrana foi lavada três vezes com TBS 1X (Tris 70mM, NaCl 100mM) e incubada durante 1 hora com o anticorpo primário anti-Canacistatina na diluição de 1:5000 em TBS 1X. Depois disso, a membrana foi novamente lavada 3 vezes com TBS 1X (Tris 70mM, NaCl 100mM) e incu-

bada durante 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG Mouse (SIGMA # A3562) na diluição de 1:10000 em TBS 1X. Depois da incubação, a membrana foi novamente lavada e revelada com a solução *I-STEP NBT-BCIP* (PIERCE # 34042).

3.2.9 – Purificação da proteína expressa

A etapa seguinte foi a purificação da proteína Canacistatina recombinante. Como o gene que codifica para a Canacistatina foi clonado em fusão com a cauda de histidina, derivada do plasmídeo de expressão pFastBac HT B, a proteína foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel Ni-NTA Superflow (QIAGEN), devido à afinidade dos resíduos de histidina presentes nas proteínas com o níquel presente na coluna.

A coluna foi montada adicionando-se 4ml da mistura de resina Ni-NTA Superflow (QIAGEN # 30430) em solução de álcool etílico, para ter uma coluna com 2ml de resina de níquel empacotada após a eluição do álcool. O sistema foi mantido à temperatura ambiente. Inicialmente, a coluna foi lavada com três volumes (6 ml) de H₂O mili-Q (MILLIPORE), seguida pela adição de cinco volumes (10 ml) de tampão de lise (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM; pH 8,0) para equilibrar a coluna. Em seguida, o sobrenadante (12 ml) proveniente da lise das células de inseto foi filtrado em MFTM-Membrane Filters 0,45 µM (MILLIPORE) e passado na coluna de níquel e coletado em um Tubo Falcon de 15 ml. Posteriormente, foi passado na coluna 5 ml do Tampão de Lavagem (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 20mM; pH 8,0) por duas vezes e, por último, 2 ml do Tampão de Eluição (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 250mM; pH 8,0) por três vezes (ZHANG *et al*, 2006).

Todas as frações foram coletadas separadamente e alíquotas de 50 µl das mesmas foram analisadas em SDS-PAGE 15% para análise da purificação.

A purificação e procedência da proteína foram confirmadas por *Western blot*, como descrito anteriormente.

As frações contendo a proteína Canacistatina recombinante purificada foram dialisadas em sacos de diálise 3500MWCO (PIERCE) para retirada do imidazol e do excesso de sal. A membrana contendo a proteína foi submersa em um litro de tampão (NaCl 50 mM, Tris 10 mM; pH8,0). Foram feitas quatro trocas de tampão a cada duas horas e o sistema foi mantido a 4°C *overnight*. Após a diálise a proteína foi coletada em tubos Falcon e mantida a 4°C até sua utilização.

3.2.10 – Determinação da concentração da proteína purificada

A concentração da proteína purificada foi determinada segundo BRADFORD (1976), utilizando-se o reagente de Bradford. Para tanto, 250 µl do reagente foi diluído em 1 ml de H₂O e, a essa mistura, foi adicionado 25 µl da proteína purificada. O branco foi preparado substituindo-se a proteína pelo tampão de diálise. Os tubos foram agitados vigorosamente e após 3 minutos a leitura foi realizada em espectrofotômetro (SPECTRONIC® GENESYS™ 2 – *Spectronic Instruments*) a 595 nm.

3.2.11 – Teste de inibição enzimática de proteases com a proteína purificada

Para os testes de inibição e de estabilidade foram utilizadas as proteínas Canacistatina recombinantes produzidas no sistema baculovírus/células de inseto, produzida neste trabalho, e a proteína Canacistatina recombinante produzida em sistema bacteriano (segundo SOARES-COSTA *et al*, 2002).

Os ensaios de atividades de inibição de proteases foram realizados em espectrofluorímetro HITACHI F-2000, em cubeta de quartzo de 500 µl mantida em compartimento termostático a 37°C. A atividade inibitória foi medida através da hidrólise do substrato Z-FR-MCA pela enzima papaína na presença dos inibidores, como segue.

À cubeta de quartzo para fluorescência foram adicionados 500 µl do tampão fosfato (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM; pH 6,0), 1 µl DTE (1 M) e 1µl da cisteíno-protease Papaína (200 nM). Após 3 minutos de incubação, adicionou-se 2 µl do inibidor Canacistatina (1,34 mg/ml). Após mais 3 minutos de incubação, adicionou-se 1 µl do substrato Z-FR-MCA (1 mM) e observou-se a curva de inibição.

A constante de inibição (K_i) foi determinada em dose única conforme descrito por BEYNON e BOND (1989) pela fórmula:

$$v_0/v_i = 1 + [I]/K_{i_{app}}$$

Estes ensaios foram realizados em colaboração com a professora Dra. Adriana Karaglanovic Carmona, do Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.

3.2.12 – Determinação da estabilidade da proteína Canacistatina recombinante

3.2.12.1 – Estabilidade em diferentes valores de pH

Cinco microgramas (125 nM) da proteína inibidora foram incubados em 20 µl de tampões de diferentes valores de pH (tampões acetato de sódio 20 mM pH 3,6 e pH 4,95; tampões fosfato de sódio 20 mM pH 5,6, pH 6,7 e pH 7,5; e tampão Tris-HCl pH 8,8) por 30 minutos a 37°C. Em seguida, 10 µl das misturas foram utilizados na reação de inibição contra a enzima papaína para determinação da porcentagem de atividade enzimática residual, como descrito por RASHID *et al*, 2006.

3.2.12.2 – Estabilidade térmica

Cinco microgramas (115 nM) da proteína foram incubados em 20 µl de tampão fosfato de sódio (pH 6,0) em várias temperaturas (50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C e 100°C) por 30 minutos e rapidamente resfriadas em água gelada, como descrito em RASHID *et al*, 2006. Em seguida, 10 µl da mistura foi utilizado na reação de inibição contra a enzima papaína para determinação da porcentagem da atividade residual da enzima. Essa reação foi feita sem pré-incubação do inibidor. Dessa forma, foram adicionados à cubeta de quartzo 500 µl do tampão fosfato (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 5 mM; pH 6,0), 1 µl DTE (1 M), 1 µl da cisteíno-protease Papaína (200 nM), 1 µl do substrato Z-FR-MCA (1 mM) e observou-se a curva de hidrólise do substrato por 5 minutos. Adicionou-se 10 µl do inibidor Canacistatina pré-tratado e permitiu-se a ocorrência da hidrólise por mais 5 minutos. Após esse tempo, os dados obtidos foram utilizados para determinação da porcentagem de atividade enzimática residual.

4 – RESULTADOS

4.1 – Isolamento da ORF Canacistatina e subclonagem no vetor pFastBac HT B

A ORF da Canacistatina foi obtida por meio de amplificação utilizando-se o vetor pET28a-Canacistatina como molde. O produto de amplificação resultou em um fragmento de aproximadamente 300 pares de bases, como mostrado na figura 9.

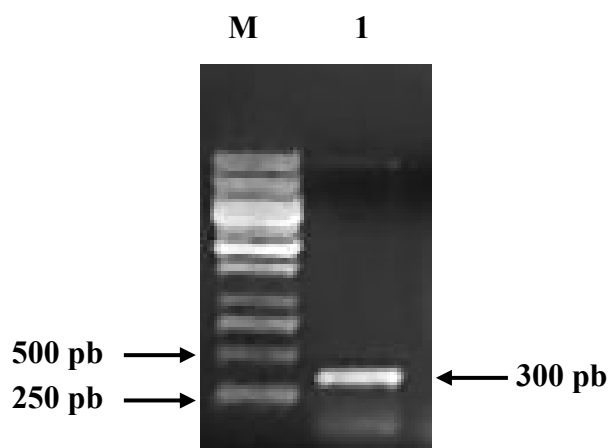


Figura 9. Amplificação da ORF da Canacistatina a partir do plasmídeo pET28a-Canacistatina. Fotografia de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Em M, Marcador de peso molecular de DNA 1 Kb; em 1, banda de aproximadamente 300 pb, correspondente à ORF da Canacistatina.

O produto de amplificação correspondente à fase aberta de leitura da Canacistatina foi ligado no vetor pFastBac HT B e, após a transformação da ligação em células DH5 α , foi possível a obtenção de colônias transformantes.

A subclonagem da ORF da Canacistatina no vetor pFastBac HT B foi verificada através de PCR das colônias transformantes resistentes ao antibiótico ampicilina, utilizando-se os *primers* específicos para o gene da Canacistatina. Dentre os produtos de amplificação, foi possível observar bandas de tamanho esperado, de aproximadamente 300 pares de bases, referentes ao gene de interesse, como demonstrado na figura 10.

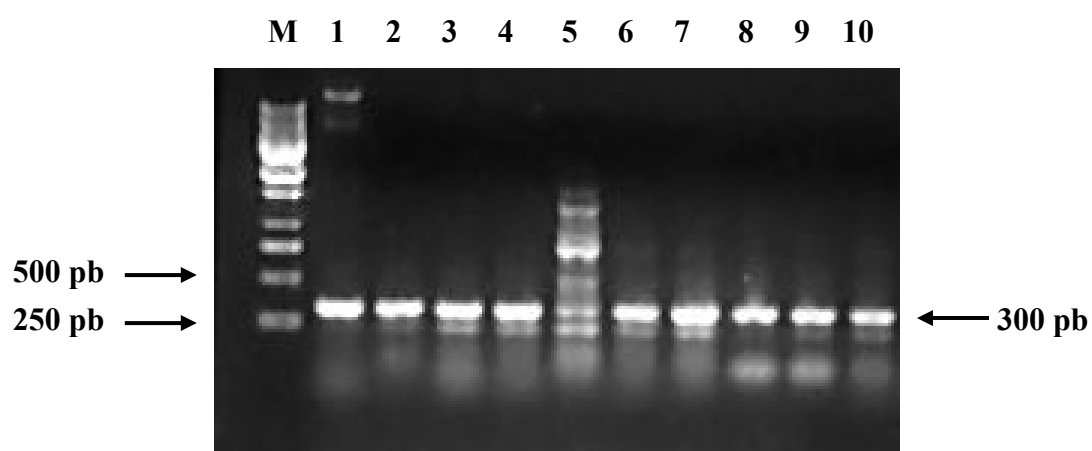


Figura 10. Amplificação do plasmídeo de expressão pBAC-CaneCPI por PCR de colônia. Fotografia de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Em M, Marcador de peso molecular 1Kb; 1, controle positivo (pET28a-Canacistatina); 2 a 10, amplificação de clones recombinantes.

Após a amplificação, o clone recombinante 2 foi selecionado e seqüenciado, permitindo verificar que o mesmo continha a seqüência completa e corretamente integrada no vetor de expressão pFastBac HT B, sendo denominado pBac-CaneCPI. O sequenciamento demonstrou a integridade da ORF da Canacistatina e, dessa forma, esse clone foi utilizado para transformar bactérias competentes DH10Bac.

4.2 – Obtenção dos bacmídeos recombinantes

Após a transformação do plasmídeo recombinante pBAC-CaneCPI anteriormente selecionado na bactéria competente DH10Bac, as colônias brancas resistentes aos antibióticos tetraciclina, kanamicina e gentamicina foram submetidas a PCR de colônias para confirmar a transposição. As colônias em que a análise por PCR confirmou a ocorrência das transposições apresentaram produtos de amplificação com os tamanhos esperados, como mostrado na figura 11. Os tamanhos esperados para os produtos de PCR são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Tamanhos esperados dos produtos de PCR usando diferentes combinações de *primers* para bacmídeos contendo o gene de interesse após transposição.

Combinação de <i>Primers</i>	Tamanho do produto de PCR
M13 <i>Forward</i> + M13 <i>Reverse</i>	~2650 pb
M13 <i>Forward</i> + Cane <i>Reverse</i>	~2040 pb
Cane <i>Forward</i> + M13 <i>Reverse</i>	~920 pb

4.4 – Confirmação da inserção do bacmídeo no genoma das células de inseto

O DNA extraído de BV foi utilizado como molde em uma reação de amplificação usando os *primers* específicos do gene Canacistatina. Os produtos da amplificação do DNA de BV apresentaram os tamanhos esperados de aproximadamente 3500 pb, quando foram utilizados os *primers* M13 e de aproximadamente 300 pb, quando a amplificação foi feita com os *primers* específicos para a Canacistatina (figura 12).

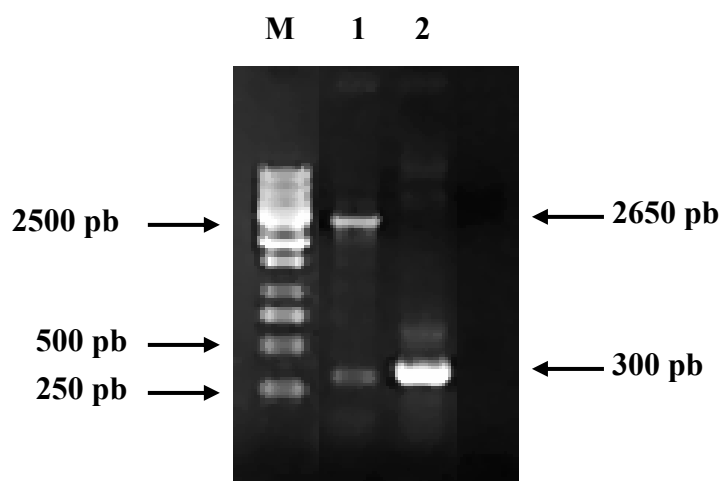


Figura 12. Amplificação do gene da Canacistatina a partir do DNA extraído de *Budded virus* (BV). Fotografia de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Em M, Marcador 1 Kb; 1, amplificação usando *primers* M13; 2, amplificação usando *primers* do gene.

Mesmo confirmando a presença do gene da Canacistatina nas novas partículas virais, foi feita também a extração de RNA das células de inseto para saber se as mesmas estavam aptas a utilizar sua maquinaria para a transcrição do gene de interesse. O RNA extraído foi utilizado para a síntese de cDNA e posterior amplificação, cujo produto apresentou o tamanho esperado de aproximadamente 300 pb, como mostrado na figura 13.

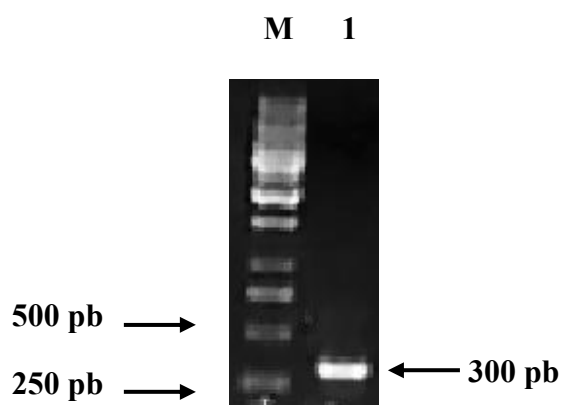


Figura 13. Amplificação do cDNA de Canacistatina a partir de RNA extraído de células de inseto. Fotografia de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Em M, Marcador 1 Kb; 1, amplificação usando *primers* do gene.

4.5 – Expressão da proteína Canacistatina recombinante em células de inseto e posterior purificação

A expressão da proteína Canacistatina nas células de inseto ocorreu de forma satisfatória, sendo observada uma banda de expressão no tamanho esperado de aproximadamente 15,7 kDa (137 aminoácidos), visualizada em SDS-PAGE, como mostrado na figura 14.

O método de purificação utilizado neste trabalho foi o de cromatografia de afinidade em coluna contendo resina de níquel. Esse sistema de purificação se mostrou bastante eficiente, uma vez que, como mostrado no SDS-PAGE (figura 14), a proteína fusionada à histidina foi capaz de se ligar à resina e foi eluída nas frações 2 e 3 coletadas após passagem do tampão de eluição, contendo 250 mM de imidazol, apresentando-se de forma pura nessas duas frações.

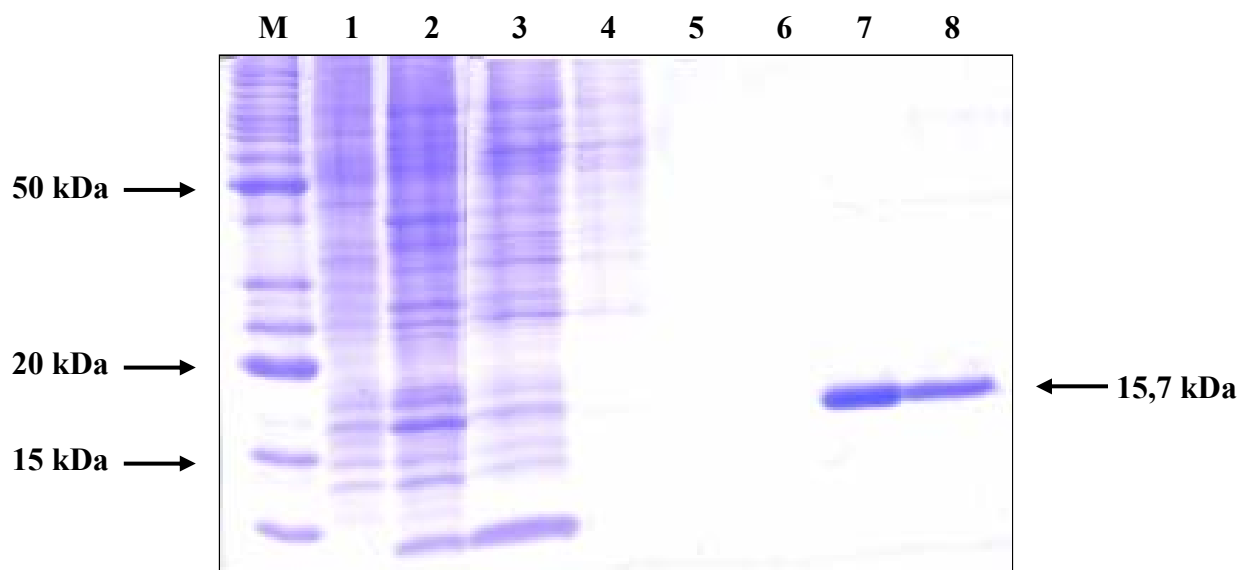


Figura 14. Visualização da purificação da proteína recombinante em resina Ni-NTA. SDS-PAGE 15% corado com Azul de Comassie mostrando as amostras coletadas durante a cromatografia. M: Marcador de peso molecular de proteína; 1: Controle negativo (células Sf9 não infectadas); 2: Extrato celular das células Sf9 infectadas por baculovírus coletadas após 96hs; 3: Fração do sobrenadante não ligada à coluna; 4: Fração 1 do tampão de lavagem; 5: Fração 2 do tampão de lavagem; 6: Fração 1 do tampão de eluição; 7: Fração 2 do tampão de eluição; 8: Fração 3 do tampão de eluição.

A purificação e procedência da proteína foram confirmadas por *Western blot*. Na figura 15 é possível observar as bandas referentes ao reconhecimento da proteína Canacistatina no controle positivo, no *pellet* e nas frações 2 e 3 do tampão de eluição pelo anticorpo anti-Canacistatina.

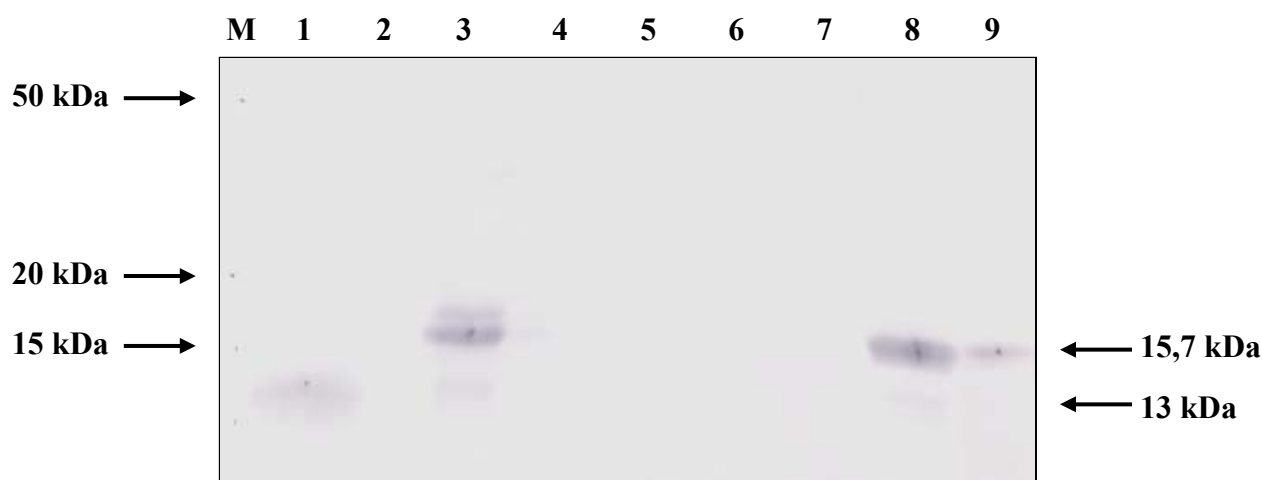


Figura 15. *Western blot* da purificação da proteína recombinante. M: Marcador de peso molecular de proteína; 1: Controle positivo (proteína Canacistatina produzida em bactéria); 2: Controle negativo (células Sf9 não infectadas); 3: Extrato celular das células Sf9 infectadas por baculovírus coletadas após 96hs; 4: Fração do sobrenadante não ligada à coluna; 5: Fração 1 do tampão de lavagem; 6: Fração 2 do tampão de lavagem; 7: Fração 1 do tampão de eluição; 8: Fração 2 do tampão de eluição; 9: Fração 3 do tampão de eluição.

O rendimento da proteína Canacistatina recombinante obtido após o processo de purificação foi em torno de 23 mg de proteína por litro de cultura. A comparação do rendimento da proteína Canacistatina produzida nos sistemas de expressão bacteriano e Baculovírus/Células de inseto pode ser verificada na tabela 3.

Tabela 3 – Comparação do rendimento da proteína Canacistatina produzida nos sistemas de expressão bacteriano e Baculovírus/Células de inseto.

	Sistema Bacteriano	Sistema Baculovírus/Células de Inseto
Volume Inicial	500 ml	20 ml
Volume Final	4 ml	4 ml
Rendimento	10 mg/L	23 mg/L

4.6 – Ação inibitória da proteína Canacistatina contra a papaína

Nos testes de atividade inibitória da proteína Canacistatina contra a cisteíno-protease papaína, o valor de $K_{i_{app}}$ (constante de inibição) da proteína produzida em Bactéria em relação à enzima foi de 3,9 nM e da proteína produzida em células de inseto foi de 52 nM.

4.7 – Determinação da estabilidade da Canacistatina recombinante

4.7.1 – Estabilidade em diferentes valores de pH

O resultado da determinação da estabilidade da Canacistatina recombinante produzida em bactéria e em células de inseto frente a diferentes condições de pH é mostrado no gráfico a seguir (figura 16). Nesse gráfico, é possível observar que as proteínas expressas em diferentes sistemas tiveram estabilidades similares em relação a diferentes valores de pH.

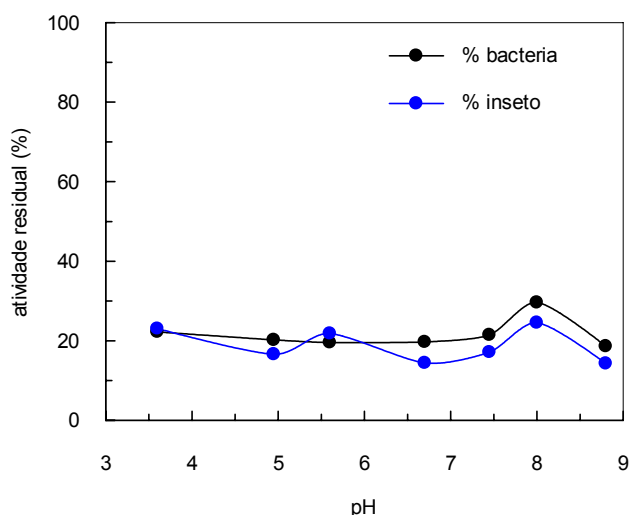


Figura 16. Gráfico da determinação da estabilidade do inibidor Canacistatina produzido nos sistemas de expressão bacteriano e em células de inseto em diferentes valores de pH.

4.7.2 – Estabilidade térmica

O gráfico abaixo mostra o resultado da determinação da estabilidade da Canacistatina recombinante produzida em bactéria e em células de inseto após tratamento da proteína inibidora em diferentes temperaturas (figura 17). De acordo com o gráfico, as proteínas se comportam de forma similar, permanecendo ativas após o tratamento em temperaturas variando de 50 a 100°C.

Figura 17. Gráfico da determinação da estabilidade do inibidor Canacistatina produzido nos sistemas de expressão em bactéria e em células de inseto após tratamento em diferentes temperaturas.

5 – DISCUSSÃO

5.1 – Isolamento da ORF Canacistatina e subclonagem no vetor pFastBac HT B

A seqüência do gene da canacistatina pode ser encontrada na página do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) por meio do número de acesso AY119689. Como descrito por SOARES-COSTA *et al* (2002), este clone é proveniente do banco de dados do SUCEST e foi caracterizado como uma cistatina, devido à semelhança com outras fitocistatinas anteriormente caracterizadas, como a Orizacistatina, e à presença dos motivos conservados comuns às cistatinas envolvidos na interação com o sítio catalítico das cisteíno-proteases.

A estratégia de isolamento da região codante da Canacistatina a partir do vetor pET28a-Canacistatina, proveniente do trabalho anteriormente citado, envolveu a síntese de *primers* desenhados com base na seqüência do gene de interesse, com a inclusão de sítios de restrição para as enzimas *Nco* I e *Hind* III. Essas enzimas foram selecionadas devido à sua presença no sítio de clonagem múltipla do vetor de expressão pFastBac HT B, como indicado na figura 18.



Figura 18. Região do plasmídeo de expressão mostrando o promotor da poliedrina, seqüência que codifica para a cauda de histidina, sítio de reconhecimento à protease TEV e o sítio de múltipla clonagem. Fonte: Manual Bac-to-Bac *Baculovirus Expression System* (Invitrogen), 2004.

Uma das principais características desse plasmídeo é a presença do promotor da poliedrina, uma proteína produzida em grandes quantidades pelos vírus do gênero *Nucleopolyhedrovirus*. Esses vírus possuem corpos de inclusão com formato de poliedro contendo vários vírions embebidos em uma matriz cristalina formada, principalmente, pela poliedrina. A poliedrina possui massa molecular em torno de 30 kDa e corresponde a cerca de 95% do conteúdo protéico dos poliedros (CASTRO *et al*, 1999). Com base nessa abundância da poliedrina, a substituição do gene referente a essa proteína pelo gene da Canacistatina per-

mite a produção da proteína de interesse em alta quantidade, uma vez que o promotor da poliedrina é um promotor forte.

Após a inserção do gene da Canacistatina no vetor de expressão pFastBac HT B e posterior transformação das bactérias competentes DH5 α , foram selecionadas colônias que cresceram na placa contendo ampicilina, uma vez que o vetor de expressão contém o gene de resistência a esse antibiótico. Dessa forma, todas as colônias resistentes analisadas apresentaram o fragmento de aproximadamente 300 pb após amplificação por PCR usando os *primers* específicos para o gene da Canacistatina. Esse fragmento corresponde à proteína de interesse, cuja fase aberta de leitura apresenta aproximadamente 300 pares de base, como descrito por SOARES-COSTA (2004).

5.2 – Obtenção dos bacmídeos recombinantes

O vetor de expressão pFastBac HT B e as células *E. coli* competentes MAX Efficiency® DH10Bac™ possuem, em suas seqüências os sítios mini-Tn7 e mini-*att*Tn7, elementos doadores e receptores de transposição, respectivamente. Essa estratégia é baseada em um processo de recombinação de DNA presente tanto em organismos procarióticos quanto eucarióticos, denominado transposição.

A transposição é a transferência de pequenas seqüências móveis, transposons, de um sítio a outro no genoma, por ação de enzimas especializadas, as transposases, codificadas pelo próprio transposon. Além de causar variações no genoma, através de deleções ou inversões, os transposons sevem como substrato para sistemas de recombinação celular, funcionando como regiões móveis de homologia. Com isso, duas cópias de um transposon em

diferentes localizações (mesmo em diferentes cromossomos) podem fornecer sítios para recombinação recíproca (LEWIN, 2004).

Devido a essas características do transposon presentes na bactéria DH10Bac, a obtenção dos bacmídeos recombinantes torna-se um processo relativamente simples. Além disso, para facilitar a triagem dos clones contendo bacmídeos recombinantes, os sítios receptores de transposição ficam localizados no meio do gene *lacZ*, que codifica para a enzima β -galactosidase, o que permite identificar a recombinação por meio da utilização do substrato cromogênico X-gal e do indutor, IPTG. Dessa forma, os vetores baculovirais não interrompidos pela transposição do gene de interesse produzem a enzima β -galactosidase, dando origem a colônias azuis, enquanto os vetores recombinantes contendo o gene de interesse produzem colônias brancas, devido à interrupção da seqüência codificadora da enzima β -galactosidase (MONTOR e SOGAYAR, 2003).

Devido a essas características da bactéria DH10Bac, somente as colônias brancas crescidas em meio seletivo foram selecionadas e analisadas por PCR de colônias utilizando os primers M13 *forward* e *reverse*, cujos sítios flanqueiam o sítio receptor de transposição mini-*att*Tn7. Para verificar a presença do gene de interesse no bacmídeo recombinante, o PCR foi feito usando tanto os *primers* M13 *forward* e *reverse*, quanto combinações usando o *primer* M13 *forward* com o *primer reverse* do gene e o *primer forward* do gene com o *primer* M13 *reverse*.

Nos casos em que a transposição foi positiva, o tamanho esperado para o produto de amplificação utilizando-se os *primers* M13 era de aproximadamente 2730 pares de base, que equivale ao tamanho do bacmídeo (aproximadamente 2430 pb) somado ao tamanho do inserto (aproximadamente 300 pb). Para as combinações dos *primers* M13 com os *primers* específicos para o gene, os tamanhos dos produtos de amplificação são determinados com base no diagrama abaixo (figura 19):

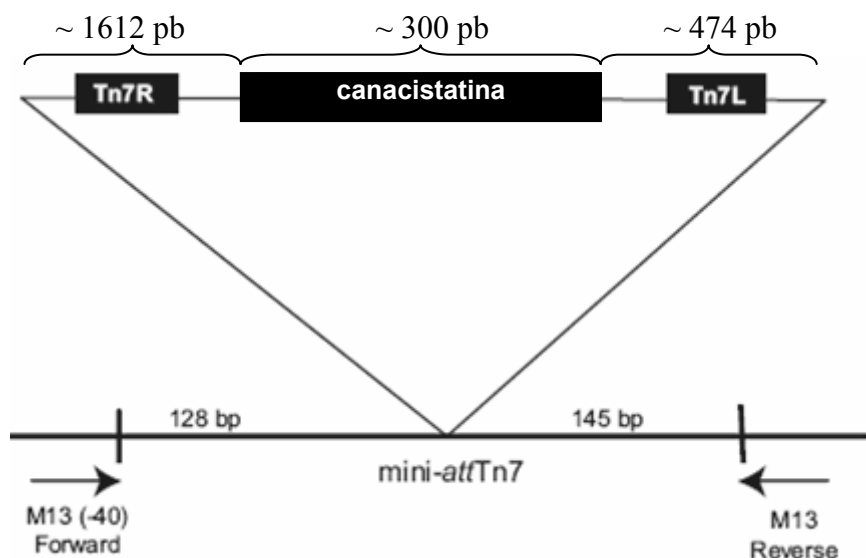


Figura 19. Diagrama ilustrando o posicionamento do cassete de expressão inserido no sítio receptor de transposição do bacmídeo, os quais são flanqueados pelos sítios dos *primers* M13 *forward* e M13 *reverse*. Fonte: Manual Bac-to-Bac *Baculovirus Expression System* (Invitrogen), 2004.

Nesse diagrama, é possível observar que a amplificação do bacmídeo recombinante com a combinação de *primers* M13 *forward* + Cane *reverse* gera um produto de aproximadamente 2040 pares de base e que a amplificação com a combinação de *primers* Cane *forward* + M13 *reverse* gera um produto de amplificação de aproximadamente 920 pares de base (tabela 1).

Como verificado na figura 11, os produtos de amplificação obtidos utilizando as diferentes combinações de *primers* tinham os tamanhos esperados, indicando a ocorrência da transposição do cassete de expressão do plasmídeo recombinante pBAC-CaneCPI dentro do sítio receptor de transposição mini-*attTn7*.

5.3 – Geração dos baculovírus recombinantes

A geração dos baculovírus é feita por transfecção, ou seja, introdução do DNA doador (bacmídeo recombinante) nas células receptoras. Dessa forma, o DNA viral se incorpora ao DNA da célula de inseto hospedeira e a RNA polimerase da célula transcreve imediatamente as primeiras moléculas de RNA mensageiro, que são traduzidas em proteínas regulatórias de toda a síntese de proteínas e genoma do vírus, inclusive a DNA polimerase viral. Em seguida, a DNA polimerase viral e outras proteínas regulatórias replicam o ácido nucléico viral e codificam proteínas importantes para a montagem de novas partículas virais, que brotam pela membrana plasmática das células hospedeiras (CASTRO *et al*, 1999; SANTOS *et al*, 2002).

Nessa etapa, foi necessária uma série de modificações do protocolo proposto pelo manual do Kit Bac-to-Bac *Baculovirus Expression System* (2004). Entre elas, uma das alterações foi no tempo de incubação das células após a transfecção. De acordo com o manual, as células deveriam ser incubadas por 72 horas ou até que fossem visualizados os primeiros sinais de infecção viral (tabela 4).

Tabela 4 - Características normalmente observadas em células de inseto infectadas por vírus

Sinais de infecção	Fenótipo	Descrição
Fase inicial (< 24 horas)	Aumento do diâmetro celular	Diâmetro celular aumenta de 25-50%
	Aumento do tamanho do núcleo	Núcleo parece “preencher” toda a célula
Fase tardia (24-72 horas)	Parada no crescimento celular	Células parecem parar de crescer em comparação a uma única célula controle
	Aparência granular	Sinais de brotamento viral; aparência vesicular das células
	Desadesão	Células se liberam da placa ou frasco.
Fase muito tardia (> 72 horas)	Lise celular	Células sofrem lise e há claros sinais de clareamento na monocamada

Segundo o manual Bac-to-Bac *Baculovirus Expression System* (2004), os BV devem ser liberados no meio de cultura 72 horas após a infecção. Entretanto, caso a eficiência de transfecção não seja ótima, as células podem não mostrar todos os sinais de infecção viral até quatro ou cinco dias após a transfecção. Uma vez que a identificação dessas características somente por análise visual é um método bastante subjetivo e que requer certa experiência na manipulação de cultura de células infectadas, fica difícil estimar a eficiência da transfecção. Dessa forma, visando otimizar a produção do estoque P1, o tempo de incubação das células após a transfecção foi aumentado para sete dias. Nesse estoque, além de partículas virais, também ocorre a produção da proteína recombinante de interesse, mas em pequenas quantidades, sendo necessário amplificar o estoque para produzir a proteína em maior escala.

Para a amplificação do estoque P1, a sugestão do manual é que as células sejam infectadas em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,05 a 0,1, sendo que MOI é o número de partículas virais por células. Considerando que o estoque viral P1 tenha um título viral variando entre 1×10^6 a 1×10^7 pfu/ml (estimativa apresentada no manual), utilizou-se 1 ml desse estoque para infectar 1 milhão de células, garantindo, dessa forma, que cada célula seria infectada por, pelo menos, uma partícula viral (MOI variando de 1 a 10). O volume de estoque viral requerido foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Inóculo requerido (ml)} = \frac{\text{MOI (pfu/céls)} \times \text{n}^\circ \text{ células}}{\text{Título do estoque viral (pfu/ml)}}$$

Esse estoque também foi incubado por sete dias e a seguir titulado para os experimentos de expressão posteriores. Para a titulação, o método de escolha foi o *end-point dilution*, descrito em O'REILLY *et al* (1994), um método bastante eficiente e muito mais sim-

ples e rápido que o ensaio de placas sugerido pelo manual. Esse método foi proposto por Reed e Muench em 1938 e envolve a inoculação de múltiplas culturas com diferentes diluições do vírus e a estimativa da diluição do vírus que infectaria 50% das células (ponto final de diluição). Esta quantidade de vírus é conhecida como a dose que infecta metade da cultura de tecidos, ou TCID₅₀. Títulos virais determinados desta maneira podem ser expressos como TCID_{50/ml} ou convertidos a pfu/ml. Este tem sido o método mais utilizado em virologia animal e é bastante adequado para este caso (O'REILLY *et al*, 1994).

Duas outras etapas incluídas no processo de caracterização do estoque viral foi a identificação de partículas virais recombinantes e a amplificação do cDNA da Canacistatina a partir do RNA extraído das células de inseto infectadas.

Para verificar se as novas partículas virais produzidas a partir da maquinaria das células de inseto continham o gene de interesse, o material inicial utilizado, considerado o mais conveniente para a preparação de DNA viral, foram os *Budded virus* (BV). BV é uma forma de vírus liberada por brotamento da membrana plasmática no fluido extracelular (O'REILLY *et al*, 1994). A presença do gene de interesse no DNA de BV, verificado por PCR permitiu afirmar que as novas partículas virais produzidas nas células de inseto continham o gene da Canacistatina, ou seja, eram recombinantes.

Mesmo confirmando a presença do gene da Canacistatina nas novas partículas virais, foi feita também a extração de RNA das células de inseto para saber se as mesmas estavam aptas a utilizar sua maquinaria para a transcrição do gene de interesse. O RNA extraído foi utilizado para a síntese de cDNA e posterior amplificação, cujo produto apresentou o tamanho esperado, evidenciando que os baculovírus recombinantes eram capazes de produzir suas próprias proteínas e, juntamente com elas, a proteína de interesse Canacistatina.

5.4 – Expressão e purificação da proteína Canacistatina recombinante

A proteína apresenta o tamanho 15,7 kDa, visualizado na figura 14, uma vez que a ORF de 318 pb codifica para uma proteína de aproximadamente 11,8 kDa, à qual foram adicionados aminoácidos extras derivados do vetor, como a cauda de histidina e o sítio de reconhecimento da protease TEV presentes no vetor de expressão (Figura 20).

```

5'  M   S   Y   Y   H   H   H   H   H   H   D   Y   D   I
    ATG TCG TAC TAC CAT CAC CAT CAC CAT CAC GAT TAC GAT ATC
    P   T   T   E   N   L   Y   F   Q   G   A   M   A   E
    CCA ACG ACC GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGC GCC ATG GCC GAG
A   H   N   G   R   R   V   G   M   V   G   D   V   R
GCA CAC AAC GGG CGG CGC GTG GGG ATG GTG GGC GAC GTC CGG
D   A   P   A   G   H   E   N   D   L   E   A   I   E
GAC GCG CCG GCC GGC CAC GAG AAC GAC CTC GAG GCC ATC GAG
L   A   R   F   A   V   A   E   H   N   S   K   T   N
CTC GCG CGC TTC GCC GTC GCC GAG CAC AAC AGC AAG ACC AAC
A   M   L   E   F   E   R   L   V   K   V   R   H   Q
GCG ATG CTG GAG TTC GAG AGG CTG GTG AAG GTG AGG CAC CAG
V   V   A   G   T   M   H   H   F   T   V   Q   V   K
GTG GTG GCC GGG ACC ATG CAC CAC TTC ACC GTC CAG GTG AAG
E   A   G   G   G   K   K   L   Y   E   A   K   V   W
GAG GCC GGC GGC GGC AAG AAG CTG TAC GAG GCC AAG GTG TGG
E   K   V   W   E   N   F   K   Q   L   Q   S   F   Q
GAG AAG GTG TGG GAG AAC TTC AAG CAG CTG CAG AGC TTC CAG
P   V   G   D   A   K   L   V   E   K   Y   ***
CCG GTC GGG GAC GCC AAG CTT GTC GAG AAG TAC TAG 3'

```

Figura 20. Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da construção do vetor pBAC-CaneCPI que codifica para a proteína Canacistatina recombinante. A ORF da Canacistatina é mostrada em negrito, a cauda de histidina (6xHis) é indicada pelo quadro e o sítio de reconhecimento da protease TEV, em itálico.

Essa construção resulta em uma seqüência de 414 nucleotídeos, a qual equivale a uma proteína de aproximadamente 15,7 kDa (137 aminoácidos), como mostrado na figura 14.

Na purificação, a escolha do método de cromatografia de afinidade em coluna de níquel se deve à presença da cauda de afinidade 6xHis fusionada à proteína Canacistatina recombinante, que apresenta alta afinidade ao íon metálico níquel fixado à matriz.

Esse sistema de purificação é baseado na notável seletividade e afinidade da matriz de cromatografia de afinidade ao metal Níquel-Ácido nitriloacético (Ni-NTA) (QIAGEN) por biomoléculas fusionadas aos seis resíduos de histidinas consecutivos, presentes no plasmídeo de expressão.

A cauda de afinidade 6xHis é uma cauda pequena, sem cargas e, dessa forma, geralmente não afeta a secreção, compartimentalização ou enovelamento da proteína de fusão dentro da célula. O ácido Nitriloacético (NTA), por sua vez, apresenta quatro sítios de que-
lação ao níquel. Dessa forma, o NTA ocupa quatro dos seis sítios de ligação do íon níquel, deixando dois sítios livres para interagir com a cauda de histidina (*The QIAexpressionist* (QIAGEN), 2003).

Diante disto, ao passar a mistura protéica pelo complexo matriz-ligante, ocorre uma interação entre a proteína em fusão com a His-tag e o ligante imobilizado, uma vez que a histidina tem a capacidade de ligação ao metal divalente Ni^{2+} .

Para a obtenção da proteína pura, o composto imidazol, que é parte integrante da estrutura do aminoácido histidina, foi adicionado à coluna em altas concentrações (250 mM), devido à sua capacidade de competir com a cauda de histidina ligada à proteína de interesse, dissociando-a e se ligando aos íons níquel imobilizados na matriz.

O rendimento da proteína Canacistatina recombinante obtido após o processo de purificação foi em torno de 23mg de proteína por litro de cultura. Esses resultados são bastante

satisfatórios, uma vez que demonstra que o sistema de expressão baculovírus/células de inseto produziu duas vezes mais proteína que o sistema de expressão bacteriano, como descrito por SOARES-COSTA *et al* (2002).

5.5 – Ação inibitória da proteína Canacistatina contra a papaína

Segundo OLIVA *et al* (2004), a Canacistatina é uma proteína capaz de inibir a cisteíno-protease papaína com grande eficiência. Além disso, é capaz de inibir diversas cisteíno-proteases humanas com grande especificidade, como as catepsinas V, K e L (OLIVA *et al*, 2004; SOARES-COSTA, 2004). Essas características revelam que a Canacistatina tem um grande potencial para ser aplicada na área médica, principalmente nas condições patológicas associadas ao desbalanço da atividade normal dessas enzimas.

Neste trabalho, foram calculadas as constantes de inibição da proteína Canacistatina em relação a enzima papaína. A proteína Canacistatina foi expressa em dois sistemas diferentes: sistema bacteriano e em células de inseto. O intuito desse ensaio foi verificar se a proteína Canacistatina, exposta a diferentes ambientes de expressão, o procariótico e o eucariótico, apresentaria diferenças quanto à sua atividade inibitória. Para isso, a proteína inibidora foi ensaiada contra a cisteíno-protease papaína, enzima considerada protótipo da maioria das cisteíno-proteases de planta.

Os valores de K_i resultantes desse ensaio foram 3,9 nM da Canacistatina produzida em bactéria e 52 nM da Canacistatina produzida em células de inseto. Esses resultados demonstraram que não há diferença significativa de atividade entre as proteínas produzidas

nos dois sistemas de expressão, uma vez que a proteína produzida em bactéria foi aproximadamente dez vezes mais específica que aquela produzida em células de inseto.

Uma vez que os valores de K_i foram determinados utilizando uma única dose de inibidor, ou seja, apenas uma concentração, esses resultados apenas permitem verificar que a proteína produzida nos dois sistemas é ativa contra a cisteíno-protease papaína.

Entretanto, para obter resultados mais acurados, os experimentos deveriam ser repetidos em diversas concentrações do inibidor Canacistatina (BEYNON e BOND, 1989).

5.6 – Estabilidade da proteína Canacistatina em pH e temperatura

O efeito do pH na atividade da Canacistatina foi examinado em diversos valores de pH. Como mostrado na figura 16, a proteína Canacistatina produzida nos diferentes sistemas apresentou-se estável no intervalo de pH variando de 3,5 a 9,0. Além disso, este inibidor também se mostrou estável a temperaturas variando de 50°C a 100°C, podendo-se observar uma pequena perda de atividade da proteína Canacistatina produzida em células de inseto, após tratamento a 100°C (figura 17). Esses resultados estão de acordo com outras cistatinas que demonstram estabilidade térmica e a pH, como a cistatina placentária humana (HPC) (RASHID *et al*, 2006), as cistatinas de músculo bovino (BEIGE *et al*, 1985 *apud* RASHID *et al*, 2006), de cabra (SADAF *et al*, 2005) e de galinha (SAXENA e TAYYAB, 1997).

As proteínas são macromoléculas cujas funções biológicas dependem da manutenção de sua estrutura tridimensional. Dessa forma, a compactação das estruturas protéicas, por meio das interações que mantêm as estruturas terciárias e quaternárias, garante a estabilização e a proteção das funções biológicas das proteínas (GOMES, 2005).

O conhecimento da base molecular da estabilidade das proteínas tem grande importância prática na otimização das aplicações biotecnológicas em nível industrial. Nesse setor, o uso de proteínas purificadas vem facilitando vários processos, aumentando a capacidade catalítica, reduzindo a utilização de produtos indesejáveis e aumentando a reprodutibilidade do processo. Entretanto, além do custo de produção, uma das maiores dificuldades se deve à relativa instabilidade de algumas proteínas durante o processo catalítico, principalmente em resposta a extremos de temperatura e pH ou à presença de agentes químicos desnaturantes (GOMES, 2005; PRICE e STEVENS, 1999).

O conhecimento sobre a estabilidade das proteínas também tem grande importância na medicina. Um exemplo disso é a doença denominada angiopatia amilóide da Cistatina C humana, uma desordem genética dominante que provoca derrames recorrentes, podendo levar o indivíduo a morte por hemorragia cerebral antes dos 40 anos de idade. Segundo HE *et al* (2006), mutantes da cistatina C que perdem o sítio de N-glicosilação, se tornam instáveis e tendem a formar dímeros, os quais se agregam, resultando na deposição de fibrilas de cistatinas amiloidogênicas nas artérias cerebrais.

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o rendimento da produção da Canacistatina em células de inseto tenha sido dez vezes maior que na produção em bactéria e a estabilidade da proteína produzida nos dois sistemas tenha sido semelhante, a capacidade inibitória da proteína expressa em bactéria foi aproximadamente dez vezes maior que quando expressa em células de inseto. Além disso, uma estimativa do custo-benefício da produção nos dois sistemas demonstra que o sistema de expressão baculovírus/células de inseto consiste em um processo cerca de dez vezes mais caro que o sistema procariótico, além de demandar muito mais tempo de trabalho. De acordo com cálculos aproximados, observou-se que o custo de produção da Canacistatina em bactéria é de cerca de R\$ 2,00/mg e em células de inseto é de R\$ 20,68/mg.

Dessa forma, fica evidente que, no caso da expressão da proteína Canacistatina, o sistema de expressão em bactéria é a melhor opção, uma vez que é um meio rápido e barato de se produzir proteínas em quantidades satisfatórias. O sistema de expressão baculovírus/células de inseto, por outro lado, é o sistema ideal para a produção recombinante de proteínas eucarióticas que necessitam de enovelamento adequado, ligações dissulfeto e modificações pós-traducionais, características só oferecidas por sistemas de expressão eucarióticos.

7 – CONCLUSÕES

1. A transfecção das células de inseto com o DNA bacmídial recombinante gerou partículas virais contendo a região codante do gene de interesse;
2. A expressão da proteína Canacistatina em Sistema de Expressão Baculovírus/Células de Inseto foi possível, porém com algumas alterações no protocolo proposto pelo manual do kit Bac-to-Bac *Baculovirus Expression System*;
3. A purificação da proteína em coluna de níquel resultou na produção da proteína em um rendimento de 23 mg por litro de cultura, duas vezes maior que o obtido pelo sistema de expressão procariótico;
4. Os ensaios de atividade inibitória da proteína Canacistatina expressa nos diferentes sistemas, demonstraram que o inibidor foi ativo contra a enzima papaína, não apresentando diferença quanto à capacidade de inibição;
5. A proteína Canacistatina apresentou estabilidade em sua atividade em diferentes valores de pH e temperatura, independente do sistema em que foi expressa.
6. A proteína Canacistatina foi um modelo de estudo adequado para a implementação do sistema de expressão de proteínas heterólogas em células de inseto no LBM-UFSCar.

8 – BIBLIOGRAFIA

ABE, M. et al. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin: molecular cloning and expression studies. **Eur. J. Biochem.**, v. 209, n. 3, p. 933-7, 1992.

ABE, K. et al. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin): homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seed. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 16793-16797, 1987.

ABRAHAMSON, M. Cystatins-proteins inhibitors of papain-like cysteine proteinases. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science.**, v.45, n.5, p. 299203, 1993.

ABRAHAMSON, M.; FERNANDEZ, M. A; NATHANSON, C. M. Cystatins. **Biochem. Society.**, v. 70, p.179-199, 2003.

ALMEIDA, M; ROCHELLE, L. A.; CROCOMO, O.J. Chave analítica para determinação de dez variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). **Sci. Agric. Piracicaba**, v. 52, n. 1, p. 16-19, 1995.

ALVES, L. R. A.; BACHI, M. R. P. Oferta de exportação de açúcar do Brasil. **RER**, v. 42, n. 1, p. 09-33, 2004.

ARAI, S. et al. Plant seed cystatins and their target enzymes of endogenous and exogenous origin. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 6612-6617, 2002.

ARANTES, M. K. **Construção e caracterização cinética e fisiológica do sistema de expressão baculovírus/células Sf9 para expressão da Canacistatina.** 2007. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

ATKINSON, H. J. et al. Designs for engineered resistance to root-parasitic nematodes. **Trends Biotech.**, v. 13, p. 369-374, 1995.

BAC-TO-BAC[®] BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM: an efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins. Invitrogen Version D. Life Technologies. 2004.

BARRET, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of Proteolytic enzymes**. London: Academic Press, 2004.

BARSALOBRES, C. F. **Análise da expressão gênica induzida por *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar via macroarranjos de colônias bacterianas**. 2004. 246p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BELENGHI, B. et al. AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, p. 2593-2604, 2003.

BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes: a practical approach**. Oxford, England: 1989.

BJORK, I.; YLINENJARVI, K. Interaction of chicken cystatin with inactivated papains. **Biochem. J.**, v. 260, n. 1, p. 61-8, 1989.

BRADFORD, M.M.. A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRODWAY, R.M.; DUFFEY, S.S. Plant proteinase inhibitor: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **J. Insect. Physiol.**, v. 32, p. 827-833, 1986.

BUHLING, F.; GRONEBERG, D.; WELTE, T. Proteases and Their Role in Chronic Inflammatory Lung Diseases. **Curr. Drug Targets.**, v. 7, n. 6, p. 751-759, 2006.

- CALLIS, J. Regulation of protein degradation. **Plant Cell.**, v. 7, p. 845-857, 1995.
- CASTRO, M. E. B. et al. Biologia molecular de baculovirus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesq. Agrop. Brasil.**, v. 34, p. 1733-1761, 1999.
- COSTA-LIMA, M.A. et al. Morfogênese *in vitro* e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Rev. Brasil. Bot.**, v. 24 n.1, p. 73-77, 2001.
- DOBINSON, K.F.; LECOMTE, N.; LAZAROVITS, G. Production of an extracellular trypsin-like protease by the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, n.3, p. 227-33, 1997.
- ESTELLE, M. Proteases and cellular regulation in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 4, n.3, p. 254-60, 2001.
- FEDATTO, L. M. **Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira.** 2004. 70p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Programa de Pós-graduação em Ecologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- FERNANDES, A. M. et al. Composição Químico-Bromatológica de Variedades de Cana-de-Açúcar (*Saccharum* spp L.) com Diferentes Ciclos de Produção (Precoce e Intermediário) em Três Idades de Corte. **R. Bras. Zootec.**, v. 32, n. 4, p.977-985, 2003.
- GALLO, D. **Manual de entomologia agrícola.** São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1988.
- GIANOTTI, A. et al. Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protein Expr. Purif.**, v. 47, p. 483-489, 2006.
- GOMES, C. M. **A importância do estudo da estrutura e estabilidade de proteínas: das proteínas de termófilos à medicina.** Portugal: ITQB/UNL, 2005.

GRUDKOWSKA, M.; ZAGDANSKA, B. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. **Acta Biochim Pol.**, v. 51, n. 3, p. 609-24, 2004.

GRZONKA, Z. et al. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochim. Pol.**, v. 48 n. 1, p. 1-20, 2001.

GUTIERREZ-CAMPOS, R. et al. The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. **Nat. Biotechnol.**, v. 17, p. 1223-1226, 1999.

GVOZDEVA, E. L. et al. Interaction between proteinases secreted by the fungal plant pathogen *Rhizoctonia solani* and natural proteinase inhibitors produced by plants. **Prikl. Biokhim. Mikrobiol.**, v. 42, n. 5, p. 572-9, 2006.

HALL, A. et al. Importance of the evolutionarily conserved glycine residue in the N-terminal region of human cystatin C (Gly-11) for cysteine endopeptidase inhibition. **Biochem. J.** v. 291 (Pt 1), p. 123-9, 1993.

HE, J. et al. Prevention of amyloid fibril formation of amyloidogenic chicken cystatin by site-specific glycosylation in yeast. **Protein Sci.**, v. 15, n. 2, p. 213-22, 2006.

HINES, M.E., OSUALA, C.I., NIELSEN, S.S. Isolation and partial characterization of a soyabean cystatin cysteine proteinase inhibitor of coeopteran digestive proteolytic activity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 39, p. 1515-1520, 1991.

JOSHI, B.N. et al. Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. **Biochem. Biophys. Reserch. Commum.**, v. 245, p. 382-387, 1998.

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

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger – Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: SARVIER, 2002.

- LEUNG-TOUNG, R. et al. Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: a review. **Curr. Med. Chem.**, v. 9, n. 9, p. 979-1002, 2002.
- LEWIN, B. **Genes VIII**. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2004.
- LORITO, M. et al. Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicides. **Mol. Plant. Microbe. Interact.**, v. 7, p. 525-527, 1994.
- MARGIS, R.; REIS, E. M.; VILLERET, V. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 359, p. 24-30, 1998.
- MARRIS, E. Sugar cane and ethanol: drink the best and drive the rest. **Nature.**, v. 444, p. 670 – 672, 2006.
- MASSOTTE, D.; FLEIG, U.; PALME, K. Purification and characterization of an auxin-binding protein from *Arabidopsis thaliana* expressed in baculovirus-infected insect cells. **Protein Expr. Purif.**, v. 6, n. 3, p. 220-7, 1995.
- MENARD, R., Structure-function studies in the papain family of cysteine proteases. **J. Brazil. Assoc. Advanc. Sci.**, v. 45, p. 292-298, 1993.
- MONTOR, W. R.; SOGAYAR, M. C. Insetos como biofábricas de proteínas humanas. **Ciência Hoje.**, v. 33, p. 17-23, 2003.
- NAGATA, K.; KUDO, N.; ABE, K.; ARAI, S.; TANOKURA, M. Three-dimensional structure of oryzacystatin-I, a cysteine proteinase inhibitor of the rice, *Oryza sativa* L. japonica. **Biochemistry.**, v. 39, p. 14753-14760, 2000.
- OLCZAK, M.; OLCZAK, T. Expression and purification of active plant diphosphonucleotide phosphatase/phosphodiesterase from baculovirus-infected insect cells. **Protein Expr. Purif.**, v. 39, n. 1, p. 116-23, 2005.
- OLIVA, M.L.V. et al. Inhibitory selectivity of canecystatin: a recombinant cysteine peptidase inhibitor from sugarcane. **Biochem. Biophys. Research Commun.**, v. 320, p. 1082-1086, 2004.

O'REILLY, D.R.; MILLER, L.K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. New York: Oxford University Press, 1994.

PERNAS, M.; SANCHEZ-MONGE, R.; SALCEDO, G., Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. **FEBS Lett.**, v. 467, n. 2-3, p. 206-210, 2002.

PRICE, N. C.; STEVENS, L. **Fundamentals of enzymology: the cell and molecular biology of catalytic proteins**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 1999.

RAKWAL, R.; KUMAR, A. G.; JWAB, N. S. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. **Gene.**, v. 263, n. 1-2, p. 189-198, 2001.

RASHID, F.; SHARMA, S.; BANO, B. Detailed biochemical characterization of human placental cystatin (HPC). **Placenta**. v. 27, n. 8, p.822-31, 2006.

RAWLINGS, N.D.; BARRET, A.J. Families of cysteine peptidases. **Meth. Enzym.**, v. 244, p. 461-486, 1994.

REIS, E. M.; MARGIS, R. Sugarcane phytocystatins: Identification, classification and expression pattern analysis. **Genet. Molec. Biol.**, v.24, n. 1-4, p. 291-296, 2001.

RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants – genes for improving defenses against insects and pathogens. **Ann. Rev. Phytop.**, v. 28, p. 425-449, 1990.

RZYCHON, M.; CHMIEL, D.; STEC-NIEMCZYK, J. Modes of inhibition of cysteine proteases. **Acta Biochim. Pol.**, v. 51, n. 4, p. 861-873, 2004.

SADAF, Z.; SHAHID, P. B.; BILQEES, B. Isolation, characterization and kinetics of goat cystatins. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 142, p. 361-368, 2005.

SAKAI, D. K. Loss of virulence in a protease-deficient mutant of *Aeromonas salmonicida*. **Infect. Immun.**, v. 48, n. 1, p. 146–152, 1985.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning** – a laboratory manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Science.**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SAXENA, I.; TAYYAB, S. Protein proteinase inhibitors from avian egg whites. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 53, n. 1, p. 13-23, 1997.

SHYU, D. J. H.; CHOU, W. M.; YIU, T. J.; LIN, C. P. C.; TZEN, J. T. C. Cloning, Functional Expression, and Characterization of Cystatin in Sesame Seed. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 1350-1356, 2004a.

SHYU, D. J.; CHYAN, C. L.; TZEN, J. T.; CHOU, W. M. Molecular cloning, expression, and functional characterization of a cystatin from pineapple stem. Bioscience, **Biotech. Biochem.**, v. 68, n. 8, p. 1681-9, 2004b.

SOARES-COSTA, A. **Expressão heteróloga, purificação e estudos de atividade de uma proteína inibidora de cisteíno protease da cana-de-açúcar e posterior evolução in vitro pela técnica de DNA shuffling**. 2004. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

SOARES-COSTA, A. et al. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 296, n. 5, p. 1194-9, 2002.

SOLOMON, M. et al. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in programmed cell death in plants. **Plant Cell.**, v. 11, p. 431-444, 1999.

STUBBS, M.T. et al. The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. **EMBO J.** v. 9, n. 6, p. 1939-47, 1990.

THE QIAEXPRESSIONIST: a handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 5.ed. Local: QIAGEN, 2003.

TIFFIN, P.; GAUT, B. S. Molecular evolution of the wound-induced serine proteinase inhibitor wip 1 in zeae related genera. **Molecular Biology and Evolution.**, v. 18, n. 11, p. 2092-2101, 2001.

TURK, B.; TURK, V.; TURK, D. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. **Biol. Chem.**, v. 378, p. 141-150, 1997.

WOLF, D. H. Proteases as biological regulators: introductory-remarks. **Experientia.**, v. 48, p. 117-118, 1992.

ZHANG, F. et al. Heterologous expression of lipoprotein-associated phospholipase A2 in different expression systems. **Protein Expr. Purif.**, v. 48, n. 2, p. 300-6, 2006.

ANEXO

Amostra de uma planilha do Excel para cálculo do TCID₅₀ e título viral pelo método de Reed e Muench (1938). Os dados nos boxes B5-B11 são colocados após o experimento de *End-point dilution*. Neste caso, os dados usados no experimento descrito na página 31 são mostrados.

	A	B	C	D	E
1					
2					
3	Diluições	Nº de poços infectados	Nº de poços não infectados	Nº total infectados	Nº total não infectados
4	0,00001	11	=B9-B4	=SOMA(B4:B7)	=SOMA(C4:C4)
5	0,000001	9	=B9-B5	=SOMA(B5:B7)	=SOMA(C4:C5)
6	0,0000001	3	=B9-B6	=SOMA(B6:B7)	=SOMA(C4:C6)
7	0,00000001	1	=B9-B7	=SOMA(B7:B7)	=SOMA(C4:C7)
8					
9	Nº poços	11			
10	mls/poço	0,01			
11					
12	Prop. Dist.	= (J10-50)/(J10			
13	Log TCID	= L10-B12			
14	TCID50	= 10^B13			
15	1/TCID50	= 1/B14			
16	TCID50/ml	= B15/B10			
17					
18	pfu/ml	= B16*0,69			

Continuação da planilha:

	G	H	I	J	K
1					
2	% total				
3	infectados	Acima 50%	% Acima 50%	Abaixo 50%	Log Diluição Acima de 50%
4	=D4/(D4+E4)	SE(F5>0,5;"V","F")	SE(G5="V",G6="F"),F5,0	SE(G4="V",G5="F"),F5,0	SE(H5>0, log (A5),0),0
5	=D5/(D5+E5)	SE(F6>0,5;"V","F")	SE(G5="V",G6="F"),F6,0	SE(G5="V",G6="F"),F6,0	SE(H6>0, log (A6),0),0
6	=D6/(D6+E6)	SE(F6>0,5;"V","F")	SE(G5="V",G6="F"),F7,0	SE(G6="V",G7="F"),F7,0	SE(H7>0, log (A7),0),0
7	=D7/(D7+E7)	SE(F6>0,5;"V","F")	SE(G5="V",G6="F"),F8,0	SE(G7="V",G8="F"),F8,0	SE(H8>0, log (A8),0),0
8					
9			=SOMA(I4:I7)	=SOMA(J4:J7)	=SOMA(K4:K7)
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					