

JÁFIA LACERDA ALVES

**Clonagem, expressão e caracterização de
um inibidor de agregação plaquetária
proveniente dos complexos salivares de
sanguessugas *Haementeria depressa***

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

**São Paulo
2011**

JÁFIA LACERDA ALVES

**Clonagem, expressão e caracterização de um
inibidor de agregação plaquetária proveniente
dos complexos salivares de sanguessugas
*Haementeria depressa***

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

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientadora: Fernanda Faria

Versão Corrigida: Versão original se
encontra arquivada no serviço de
comunicação do ICB

**São Paulo
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Lacerda-Alves, Jáfia.

Clonagem, expressão e caracterização de um inibidor de agregação plaquetária proveniente dos complexos salivares de sanguessugas *Haementeria depressa* / Jáfia Lacerda-Alves. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Fernanda Faria.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Expressão de moléculas com papel na hemostasia.

Versão do título para o inglês: Cloning, expression and characterization of a platelet aggregation inhibitor from *Haementeria depressa* leech salivary complexes.

Descritores: 1. Plaqueta 2. Clonagem 3. Proteína recombinante 4. Sanguessuga 5. Expressão em *Pichia pastoris* 6. Inibidor de agregação plaquetária I. Faria, Fernanda II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0133/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de pesquisas tecnológicas

Candidato (a): Jáfia Lacerda Alves

Título da tese: Clonagem e expressão e caracterização de um inibidor de
agregação plaquetária proveniente dos complexos salivares
de sanguessugas *Haementeria depressa*

Orientador (a): Fernanda Faria

A comissão dos trabalhos de defesa de **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizado a/...../.....,

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 25 de março de 2009.

PARECER 886/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, em sua 93ª reunião realizada em 24.03.09, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: *"Análise comparativa de transcritos com possível atividade inibidora de plaquetas provenientes dos complexos salivares de sanguessugas Haementeria depressa: Clonagem, expressão e caracterização"*.

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**, condicionalmente à simplificação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, itens 1 e 7, para torná-lo de mais fácil entendimento para leigos.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, Item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **24 de março de 2010**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilmã.Srã.
JÁRIA LACERDA ALVES
Programa Interunidades de Biotecnologia
Instituto de Ciências Biomédicas - ICB-USP

Dedico esse trabalho a minha família. Em especial minha mãe que sempre me ajudou, incentivou e me apoiou incondicionalmente em minhas escolhas

Obrigada!!!

Agradecimentos

A Deus, que por mais que eu sempre estivesse distante, Ele sempre esteve perto.

A Prof. Dra. Fernanda Faria pela orientação, confiança, dedicação, amizade e apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.

À minha família, ao eterno apoio incondicional, em especial minha mãe que é minha fonte de segurança.

À Nicole Mambelli, que além de amiga me acompanhou e tanto me ajudou no desenvolvimento desse trabalho.

À Dra. Janaina de Souza Ventura por toda ajuda nos experimentos de agregação plaquetária e citometria de fluxo.

Ao Laboratório Multiusuário – Unidade de Seqüenciamento de Proteínas e Peptídeos (USeqP) sob responsabilidade da Dra. Isabel de Fátima Correia Batista e ao Dr. Rafael Marques Porto pelo seqüenciamento do N-terminal da proteína.

À Dra. Ana Marisa Chudzinsk-Tavassi por proporcionar através do Laboratório de Bioquímica a utilização de diversos equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos pesquisadores e funcionários Heleusa Sampaio Moura, Marcelo L. Santoro, que ajudaram indiretamente no andamento do trabalho.

Aos meus amigos do laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan: Daniella Gorete, Paulo Luiz de Sá Junior, Luana Wlian, Karla Roedel, Tainá Barros, Daniel Furlin, Simone Michaela Simons, Sandra Barreto, Miryam Paola Flores, Erica Akagi, Linda Carrijo pela amizade e força nas horas difíceis.

Aos Funcionários do laboratório: Valdeli, Patrícia, Márcia, Beatriz, Antônia, Silvana e Júlio.

A todos os meus doadores, que sempre estiveram dispostos a contribuir literalmente com seu próprio sangue para o bem da ciência.

As agências brasileiras de fomento à pesquisa: FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que, pelo simples convívio ao longo desses anos me ensinaram e ajudaram a crescer mais que possam imaginar.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Resumo

Lacerda-Alves J. Clonagem, expressão e caracterização de um inibidor de agregação plaquetária proveniente dos complexos salivares de sanguessugas *Haementeria depressa*. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Animais hematófagos possuem em sua saliva substâncias que permitem a fluidez do sangue, para o sucesso de sua alimentação. Com isso, têm sido descritos diversos componentes com atividades nos diferentes processos hemostáticos (coagulação, fibrinólise e agregação plaquetária). O complexo salivar da sanguessuga *Haementeria depressa* vem sendo estudado através de bioquímica clássica e análises transcriptômica e proteômica deste tecido determinaram o perfil dos transcritos e das proteínas produzidas. Dentre os transcritos mais abundantes foram encontrados três clones (H06A09, H06A02 e L02F02) que apresentaram 45%, 87% e 94% de similaridade ao LAPP, um inibidor de agregação plaquetária da sanguessuga *Haementeria officinalis*. A produção destes componentes pelo tecido foi confirmada pela análise proteômica. O LAPP é um inibidor que age pela via do colágeno e possui cerca de 13 kDa e pI de 4,0 e inibe a ligação da plaqueta ao colágeno tanto pelo epítipo do FvW quanto pelo domínio $\alpha 2\beta 1$. Assim, o objetivo do presente trabalho foi clonar, expressar e caracterizar a proteína recombinante ativa a partir do clone H06A09 para estudos de atividade desta molécula. Para obter a proteína recombinante de interesse, inicialmente a clonagem do transcrito foi realizada com sucesso em vetor pAE, porém, a expressão em sistema procaríoto apresentou alguns obstáculos já que a molécula não tinha atividade. Uma nova estratégia foi proposta, sendo realizada clonagem em vetor pPIC9K e expressão em sistema eucariótico (leveduras *Pichia pastoris* - GS115). Após a utilização de diferentes metodologias para estabelecimento das melhores condições para expressão neste sistema, foi eleito o protocolo onde a proteína recombinante era expressa a 28 °C, sob agitação de 260 rpm, e indução por 0,5% de Metanol a cada 24h, durante 72h de expressão. A molécula recombinante expressa e secretada foi submetida a diferentes metodologias para purificação, assim, determinou-se que a estratégia utilizada que melhor isolou a proteína foi a submissão do sobrenadante da expressão à diálise e concentração em sistema de ultrafiltração (Amicon 5 kDa – Millipore) seguida de uma cromatografia de gel filtração em Superdex 75 (GE), sistema FPLC, com coleta fracionada. Ensaio de agregação plaquetária confirmaram a atividade inibitória da proteína recombinante tanto em sangue total como em PRP (plasma rico em plaqueta) e plaqueta lavada, especificamente quando o agonista era o colágeno, apresentando IC50 para PRP e plaqueta lavada de 20 e 712 ng, respectivamente. Ensaio por citometria de fluxo indicaram que a proteína recombinante, diferente do LAPP, age na inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno, pela ligação à subunidade Iba do complexo GPIIb-IX-V, complexo este que usa o FvW como ponte entre a plaqueta e o colágeno, firmando assim a interação da plaqueta ao subendotélio e posterior agregação. Desta forma, o presente trabalho caracteriza o primeiro inibidor recombinante de agregação plaquetária pela via do colágeno proveniente de sanguessugas *Haementeria depressa*, e comprova que apesar de apresentar 45% de similaridade estrutural ao LAPP é um inibidor com características funcionais diferentes, e com grande potencial a ser estudado.

Palavras chave: Inibidor agregação plaquetária. Sanguessuga. Expressão em *Pichia pastoris*. Proteína recombinante.

Abstract

Lacerda-Alves J. Cloning, expression and characterization of a platelet aggregation inhibitor from *Haementeria depressa* leech salivary complexes. [Masters thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Hematophagous animals have in their saliva substances that maintain the blood fluidity to the success of their feeding. Therefore, components have been described by their activities in the hemostatic processes (coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation). The salivary complex of *Haementeria depressa* leech has been studied by classical biochemical and transcriptomic and proteomic analysis of this tissue determined the profile of transcripts and proteins produced by it. Among the most abundant transcripts were found three clones (H06A09, H06A02 e L02F02) that showed 45%, 87% e 94% of similarity to LAPP, an inhibitor of platelet aggregation from *Haementeria officinallis*, the components production was confirmed by proteomic analysis. LAPP is an inhibitor that acts by collagen pathway and has around 13 kDa and pI of 4.0, and inhibits the binding of platelet to collagen by both the epitope domain of vWF as the $\alpha 2\beta 1$. Thereby, the aim of this study was to clone, express and characterize the active recombinant protein from the clone H06A09 for studies of activity of this molecule. To obtain the recombinant protein initially cloning of transcript was successfully performed in pAE vector, however, the protein expressed in prokaryotic system presented some obstacles not presenting activity. A new strategy was proposed, being held in pPIC9K vector and expression in eukaryotic system - yeast *Pichia pastoris* (GS115). After using different methodologies to establish the best conditions for expression in this system, was elected the protocol that the recombinant protein was expressed in 28 °C, under agitation of 260 rpm, and 0.5% methanol induction every 24 hours during 72 hours of expression. The recombinant molecule was expressed in soluble portion and was subjected to different methods for purification, so it was determined that the best strategy to isolation of the protein was the concentration and dialysis of the expression supernatant by ultrafiltration system (Amicon 5 kDa – Millipore) followed by gel filtration chromatography on Superdex 75 (GE), using FPLC system. Tests confirmed the platelet aggregation inhibitory activity of the recombinant protein in whole blood, PRP (platelet rich plasma) and in washed platelets, specifically when the agonist was collagen, with IC50 to PRP and washed platelet of 20 and 712 ng, respectively. Assays by flow cytometry indicated that the recombinant protein, different from LAPP, acts to inhibit platelet aggregation induced by collagen, by the binding to the I β subunit of the GPIb-IX-V complex, this complex uses the vWF as a bridge between the platelet and collagen, thus firming the interaction of the subendothelium and subsequent platelet aggregation. Thus, this study characterized the first recombinant inhibitor of platelet aggregation through collagen pathway from *Haementeria depressa* leeches, and proves that despite having 45% structural similarity to the LAPP is an inhibitor with different functional characteristics, and with great potential to be studied.

Keywords: Platelet aggregation inhibitor. Leeches. *Pichia pastoris* expression. Recombinant protein

Lista de Figuras

Figura 1	Papel das plaquetas no processo hemostático. Adesão, ativação e agregação plaquetária.....	20
Figura 2	Representação esquemática da coagulação sanguínea.....	20
Figura 3	Plaqueta: Zonas e principais estruturas.....	22
Figura 4	Participação das plaquetas no processo de hemostasia durante a formação do tampão.....	23
Figura 5	Esquema do complexo GPIb-IX-V indicando a interação das subunidades na formação do complexo.....	25
Figura 6	Espécime de <i>Haementeria depressa</i>	31
Figura 7	Classificação sistemática da sanguessuga <i>Haementeria depressa</i>	32
Figura 8	Moléculas provenientes de sanguessugas e sua ação no sistema Hemostático.....	35
Figura 9	Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzido dos clones completos similares ao inibidor de agregação plaquetária com o LAPP de <i>Haementeria officinalis</i> (LAPP _{Hofficialis}).....	38
Figura 10	Estruturas terciárias. (A) Estrutura terciária do rLAPP (inibidor de agregação plaquetária proveniente da sanguessuga <i>H. officinalis</i>); (B) Predição da estrutura terciária da proteína proveniente do clone H06A09, da sanguessuga <i>H. depressa</i>	41
Figura 11	Mapa do vetor de expressão pAE.....	44
Figura 12	Via metabólica do metanol em <i>Pichia pastoris</i>	46
Figura 13	Mapa do vetor de expressão pPIC9K.....	47
Figura 14	Resumo das Estratégias para obtenção das moléculas recombinantes, exemplificado para o clone H06A09.....	50
Figura 15	Mapa do vetor pGEM® -11Zf.....	51
Figura 16	Programa de ciclagem para amplificação do clone H06A09.....	58
Figura 17	Interação entre resíduos vizinhos da cauda His-Tag e a matriz de Níquel-Sepharose.....	63
Figura 18	Esquema de construção do recombinante H06A09_pPIC9K.....	65
Figura 19	Mapa de Restrição do transcrito H06A09.....	76

Figura 20	Enzimas de restrição que não clivam a seqüência do clone H06A09.....	77
Figura 21	Estratégia para clonagem do inserto H06A09 proveniente do pGEM11Zf para o pAE.	78
Figura 22	Miniprep – H06A09_pGEM 11Zf.....	79
Figura 23	PCR do clone eleito.....	80
Figura 24	Digestão do plasmídeo pAE.....	81
Figura 25	Digestão do clone eleito H06A09.....	81
Figura 26	PCR de 8 colônias selecionadas da placa de transformação.....	82
Figura 27	Miniprep de colônias positivas eleitas para PCR.....	83
Figura 28	Etapas de expressão da proteína em <i>E. coli</i> linhagem BL21D3.....	84
Figura 29	Etapas de purificação da proteína em coluna de Níquel-Sephrose.....	85
Figura 30	Expressão de H06A09_pAE em linhagem BL21(DE3) induzidos por 3 horas com diferentes concentrações de IPTG.....	86
Figura 31	Expressão de H06A09_pAE em linhagem BL21(DE3) induzidos por 3 horas com 2 mM de IPTG em presença de glicose.....	87
Figura 32	Diferentes etapas de expressão de proteínas após 3 horas de indução com 2 mM de IPTG em linhagem BL21(D3).....	88
Figura 33	Diferentes etapas de expressão de proteínas em linhagem Rosetta-Gami - SDS-PAGE 15% corado com coomassie-blue.....	91
Figura 34	PCR dos clones eleitos.....	92
Figura 35	Digestão do produto de PCR do clone H06A09 e do vetor pPIC9K	93
Figura 36	PCR de colônia transformadas por eletroporação com plasmídeo H06A09_pPIC9K em <i>Pichia pastoris</i> , linhagem GS115.....	94
Figura 37	Diferentes tempos de expressão com dois meios de cultura diferentes de uma colônia pPIC9K_H06A09 em <i>P. pastoris</i> GS115 comparado a expressão do pPIC9K vazio.....	95
Figura 38	Curva de crescimento durante o período de expressão protéica com meio BMG e BMGY.....	96
Figura 39	Seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA de H06A09.....	96
Figura 40	Estratégias de purificação adotadas para proteína expressão em Sistema <i>Pichia pastoris</i>	98

Figura 41	Etapas de purificação por Ultra-filtração.....	99
Figura 42	Precipitadas com sulfato de Amônia ((NH ₄) ₂ SO ₄).....	100
Figura 43	Precipitação do sobrenadante da expressão com sulfato de Amônia ((NH ₄) ₂ SO ₄) em diferentes concentrações com e sem agitação.....	101
Figura 44	Troca Iônica – Mono Q - Perfis Cromatográficos.....	102
Figura 45	Gel filtração em Superdex 200 - Perfil Cromatográfico.....	103
Figura 46	Gel filtração Superdex 75 - Perfil Cromatográfico - Estratégia 1 de coleta dos picos.....	104
Figura 47	Perfil das frações coletados da cromatografia em gel filtração – Superdex 75.....	105
Figura 48	Teste de inibição de agregação plaquetária com a proteína recombinante semi-purificada em sangue total induzida por Colágeno.....	106
Figura 49	Fase reversa (C-18) – Perfil cromatográfico do material proveniente da cromatografia em Superdex 75 - fração 3 (300 µg)	107
Figura 50	Perfil das frações coletadas da cromatografia em fase reversa.....	108
Figura 51	Atividade da proteína em duas fases de purificação sobre a agregação plaquetária.....	109
Figura 52	Gel filtração – coluna Superdex 75 - Perfil Cromatográfico do material concentrado da expressão – Estratégia 2 de coleta dos picos.....	110
Figura 53	Perfil das 3 frações provenientes Superdex 75 (Estratégia de coleta 2).....	111
Figura 54	Perfil da fração 3 da Superdex 75 em coleta minuto a minuto.....	111
Figura 55	Perfil protéico das frações 4 e 5 coletadas da Superdex 75.....	112
Figura 56	Perfil Cromatográfico em Heparina Sepharose CL6B.....	113
Figura 57	Esquema da clonagem do transcrito H06A09 em vetor pPIC9K entre sítios EcoRI e NotI.....	115
Figura 58	Deglicosilação da proteína recombinante.....	117
Figura 59	Ação da proteína recombinante sobre agregação plaquetária em PRP induzida por colágeno.....	118

Figura 60	Ação da proteína recombinante sobre agregação plaquetária em Plaqueta lavada induzida por colágeno.....	119
Figura 61	Ação da proteína recombinante sobre agregação plaquetária em PRP induzida pelos agonistas colágeno, ADP, Ácido Araquidônico e Ristocetina.....	122
Figura 62	Ação da proteína recombinante sobre agregação plaquetária em Plaqueta Lavada induzida pelos agonistas colágeno, ADP, Ácido Araquidônico, Ristocetina e Trombina.....	124
Figura 63	Ação da Proteína recombinante sobre as subunidades $\alpha 2$ e $\beta 1$ da integrina $\alpha 2\beta 1$	126
Figura 64	Ação da Proteína recombinante sobre a subunidade IIb do complexo GPIIb/IIIa, GPIV (CD36) e P-Selectina (CD62P).....	129
Figura 65	Ação da Proteína recombinante sobre a subunidade Iba do complexo GPIb-IX-V.....	131

Lista de tabelas

Tabela 1 -	Receptores de adesão plaquetária humana.....	24
Tabela 2 -	Substâncias provenientes de sanguessugas, ações biológicas...	34
Tabela 3 -	Lista dos clones completos na biblioteca com provável envolvimento no processo de alimentação de sanguessugas <i>H.</i> <i>depressa</i>	37
Tabela 4 -	Lista dos clones mais abundantes presentes no transcriptoma do complexo salivar de sanguessugas <i>H. depressa</i>	39
Tabela 5 -	Linhagens de <i>Escherichia coli</i> utilizadas para expressão de proteínas recombinantes.....	43
Tabela 6 -	Reagentes para o preparo de meios de cultura.....	52
Tabela 7 -	Reagentes para o preparo das soluções RF-I e RF-II.....	55
Tabela 8 -	Primers utilizados para clonagem em <i>E. coli</i>	57
Tabela 9 -	Primers utilizados para a PCR do clone H06A09 para clonagem em <i>Pichia pastoris</i>	64
Tabela 10 -	Reagentes para o preparo dos meios de cultura para levedura	67
Tabela 11 -	Mediana da Intensidade de Fluorescência dos anticorpos com as subunidades da Integrina $\alpha 2\beta 1$ na presença de ausência da proteína recombinante.....	127
Tabela 12 -	Mediana da Intensidade de Fluorescência dos anticorpos CD41a, CD36 e CD62P na presença de ausência da proteína recombinante.....	130
Tabela 13 -	Mediana da Intensidade de Fluorescência dos anticorpos CD42a na presença de ausência da proteína recombinante.....	131

Lista de Abreviaturas e símbolos

°C	Graus Celsius
ADP	Adenosina Difosfato
AOX	Enzima álcool oxidase
AOX1	Gene codificante da Enzima álcool oxidase 1
AOX2	Gene codificante da Enzima álcool oxidase 2
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Soro Albumina Bovina
BMG	Bufered minimum glicerol medium
BMGY	Buffered Glycerol-complex Médiu
cDNAs	DNA complementar
dNTP	Desoxiribonucleotídeos
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
g	Força da gravidade
ESTs	<i>Expressed sequence tag</i> (etiqueta de seqüência expressa)
F	Fator
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> (Isotiocianato de Fluoresceína)
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FvW	Fator de Von Willebrand
GP	Glicoproteína
IC50	Concentração para 50% de inibição
IPTG	Isopropiltio- β -D-galactosídeo
kDa	Kilo Dalton
LAPP	<i>Leech Antiplaquet protein precursor</i>
LMW	<i>Low molecular weight</i>
pb	Pares de Base
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PE	Ficoeritrina
pH	Potencial hidrogeniônico
pl	Ponto Isoelétrico
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
SDS	<i>Sodium Duodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Duodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Eletrophoresis</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
TAE	Tris, acetato, EDTA
TFA	Ácido trifluoroacético
TBS	Salina Tris-tamponada
TBS-T	Salina Tris-tamponada com tween
UV	Ultravioleta
V	Volts

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Hemostasia.....	19
1.2	Plaquetas e glicoproteínas de Membrana.....	21
1.3	Plaquetas e Doenças Tromboembolíticas.....	28
1.4	Drogas que Interferem na Atividade Plaquetária.....	29
1.5	Hematofagia e Sanguessugas.....	30
1.6	Estudos com <i>Haementeria depressa</i>	36
1.7	LAPP – Leech Antiplatelet Protein Precursor.....	40
1.8	Expressão em Sistema Procarioto.....	41
1.9	Expressão em Sistema Eucarioto.....	45
2	OBJETIVOS.....	49
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
3.1	Obtenção do plasmídeo.....	51
3.1.1	<i>Clone eleito para expressão</i>	51
3.1.2	<i>Análise do mapa de restrição do clone</i>	52
3.1.3	<i>Inóculo do clone eleito</i>	52
3.1.4	<i>Miniprep – Extração de plasmídeo da bactéria</i>	52
3.1.5	<i>Eletroforese em Gel de Agarose</i>	53
3.1.6	<i>Eluição do DNA do Gel de Agarose</i>	53
3.1.7	<i>Quantificação de DNA</i>	53
3.1.8	<i>Sequenciamento de DNA</i>	54
3.1.9	<i>Preparo de Bactérias Cálcio-Competentes</i>	55
3.1.10	<i>Transformação do plasmídeo em bactéria DH5α</i>	56
3.2	Clonagem em Sistema Procarioto.....	56
3.2.1	<i>Desenho de primer</i>	56
3.2.2	<i>PCR - Reação da Polimerase em Cadeia</i>	57
3.2.3	<i>Digestão Enzimática do Inseto H06A09 e vetor pAE</i>	58
3.2.4	<i>Ligação do inserto ao vetor pAE</i>	59
3.2.5	<i>Confirmação da seqüência e transformação</i>	59
3.3	Expressão da Proteína Recombinante em Sistema Procarioto.....	60
3.3.1	<i>SDS-PAGE</i>	61

3.3.2	<i>Western Blotting</i>	62
3.3.3	<i>Purificação da proteína de interesse – Cromatografia por Afinidade</i> ...	62
3.4	<i>Clonagem - Sistema Eucarioto</i>	64
3.4.1	<i>Preparo do DNA recombinante para transformação da Pichia pastoris</i>	66
3.4.2	<i>Transformação em Pichia pastoris</i>	66
3.5	<i>Expressão da proteína recombinante – Sistema Eucarioto</i>	67
3.5.1	<i>Precipitação protéica por metanol/clorofórmio</i>	68
3.5.2	<i>Quantificação Protéica</i>	69
3.6	<i>Estratégias para Purificação da Proteína Recombinante</i>	69
3.6.1	<i>Concentração e diálise por ultrafiltração tangencial</i>	70
3.6.2	<i>Liofilização</i>	70
3.6.3	<i>Precipitação com Sulfato de Amônio – Salting out</i>	70
3.6.4	<i>Cromatografia em Gel Filtração</i>	70
3.6.5	<i>Cromatografia em Troca Iônica</i>	71
3.6.6	<i>Cromatografia em Fase Reversa</i>	71
3.6.7	<i>Cromatografia de Afinidade – Heparina-Sepharose</i>	72
3.7	<i>Sequenciamento do N-terminal</i>	72
3.8	<i>Deglicosilação</i>	73
3.9	<i>Atividade em testes de Agregação Plaquetária</i>	73
3.10	<i>Atividade sobre receptores plaquetários - Citometria de Fluxo</i>	74
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.1	<i>Sistema procarioto</i>	76
4.1.1	<i>Mapa de restrição do clone H06A09</i>	76
4.1.2	<i>Miniprep do H06A09_pGEM11Zf</i>	79
4.1.3	<i>PCR do H06A09 com primers H06A09 e SP6</i>	79
4.1.4	<i>Digestão Enzimática do Inseto H06A09 e do vetor pAE</i>	80
4.1.5	<i>Ligação do inserto ao vetor pAE</i>	82
4.1.6	<i>Confirmação da seqüência do H06A09_pAE</i>	83
4.1.7	<i>Expressão da Proteína Recombinante</i>	83
4.1.8	<i>Etapa de Purificação</i>	84
4.1.9	<i>Alternativas para obtenção da molécula de interesse</i>	85
4.1.9.1	<i>Diferentes concentrações de IPTG</i>	85

4.1.9.2	<i>Diferentes concentrações de glicose.....</i>	86
4.1.9.3	<i>Diferentes períodos de indução.....</i>	87
4.1.9.4	<i>Diferentes linhagens bacterianas.....</i>	90
4.2	Sistema Eucarioto – Clonagem e expressão.....	92
4.2.1	<i>Clonagem do transcrito H06A09 em pPIC9K.....</i>	92
4.2.2	<i>Digestão Enzimática do Inseto H06A09 e do vetor pPIC9K.....</i>	93
4.2.3	<i>Ligação dos insertos ao vetor pPIC9K.....</i>	93
4.2.4	<i>Expressão do vetor H06A09_pPIC9K em Pichia pastoris linhagem GS115.....</i>	94
4.3	Estratégias para purificação da proteína expressa.....	97
4.3.1	<i>Concentração e Diálise.....</i>	98
4.3.2	<i>Precipitação com Sulfato de Amônia - salting out.....</i>	99
4.3.3	<i>Cromatografia de Troca iônica - Mono Q.....</i>	101
4.3.4	<i>Cromatografia em Gel filtração - Superdex 200.....</i>	103
4.3.5	<i>Cromatografia em Gel filtração - Superdex 75 (Estratégia de coleta 1).....</i>	104
4.3.6	<i>Cromatografia em fase Reversa - C-18.....</i>	106
4.3.7	<i>Cromatografia em Gel filtração - Superdex 75 (Estratégia de coleta 2).....</i>	110
4.3.8	<i>Cromatografia de Afinidade - Heparina-Sepharose.....</i>	113
4.4	Rendimento Proteico.....	114
4.5	Sequenciamento no N-terminal.....	115
4.6	Deglicosilação da proteína recombinante.....	116
4.7	Atividade sobre agregação plaquetária.....	117
4.7.1	<i>Atividade sobre agregação plaquetária induzida por colágeno.....</i>	117
4.7.1.1	<i>Ensaio com PRP.....</i>	118
4.7.1.2	<i>Ensaio com Plaqueta Lavada.....</i>	119
4.7.2	<i>Atividade sobre agregação plaquetária induzida por outros agonistas.....</i>	120
4.7.2.1	<i>Ensaio com PRP.....</i>	121
4.7.2.2	<i>Ensaio com Plaqueta Lavada.....</i>	123
4.8	Estudo de Receptores plaquetários – Citometria de fluxo.....	125
4.8.1	<i>Integrina $\alpha_2\beta_1$ (GPIIb/IIIa).....</i>	125

4.8.2	<i>GPIIb/IIIa (CD41a), GPIV (CD36) e P-selectina (CD62P)</i>	127
4.8.5	<i>Complexo GPIb-IX-V</i>	130
5	CONCLUSÃO	137
	REFERÊNCIAS	139

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hemostasia

O processo de hemostasia é definido como um conjunto de mecanismos fisiológicos e bioquímicos utilizados pelo organismo para manter o sangue fluido no interior dos vasos, impedindo a formação de trombos e desencadeando uma série de reações que resultam no fechamento de lesões na parede vascular, impedindo uma hemorragia e promovendo a manutenção de um equilíbrio (Gallin e Snyderman, 1999; Verrastro, 1999; Cotran; 2000). Os vertebrados possuem mecanismos eficientes para evitar a perda de sangue provocada pela lesão vascular. Os principais mecanismos utilizados para o controle da hemostasia no indivíduo são a vasoconstrição local, adesão de plaquetas ao subendotélio, formação de agregados plaquetários, coagulação e fibrinólise (Vermylen, 1978; Garcia-Navarro, 2005).

No caso de injúria do vaso sanguíneo, um tampão é formado sobre a superfície danificada do endotélio vascular, a hemostasia primária é realizada por uma combinação dos processos de vasoconstrição, adesão e agregação plaquetária, ativando os fatores de coagulação presentes no plasma na forma de zimogênios, que convertem o próximo precursor na sua forma ativa (Mann, 1999). Esse processo mantém a integridade do sistema circulatório, minimizando a perda sanguínea, mantendo o equilíbrio e promovendo a restauração da arquitetura normal do vaso (Adams et al., 2007).

Na hemostasia primária após a lesão endotelial a matriz colágena e as proteínas subendoteliais ficam expostas, nesse local os receptores de membrana das plaquetas se ligam, resultando na adesão plaquetária, tendo como principal componente para a ligação o Fator Von Willebrand (FvW). Múltiplos agonistas são gerados nesse momento, eles induzem a ativação plaquetária, ocasionando alterações nos receptores da glicoproteína (GP) IIb/IIIa e levando a um estado de receptividade à ligação do fibrinogênio. Nessa fase, as plaquetas se encontram definitivamente ativadas. Em seguida, inicia-se o processo de agregação plaquetária, com a ligação múltipla e cruzada do fibrinogênio aos receptores GP IIb/IIIa (Figura 1) (Kössler, 2009).

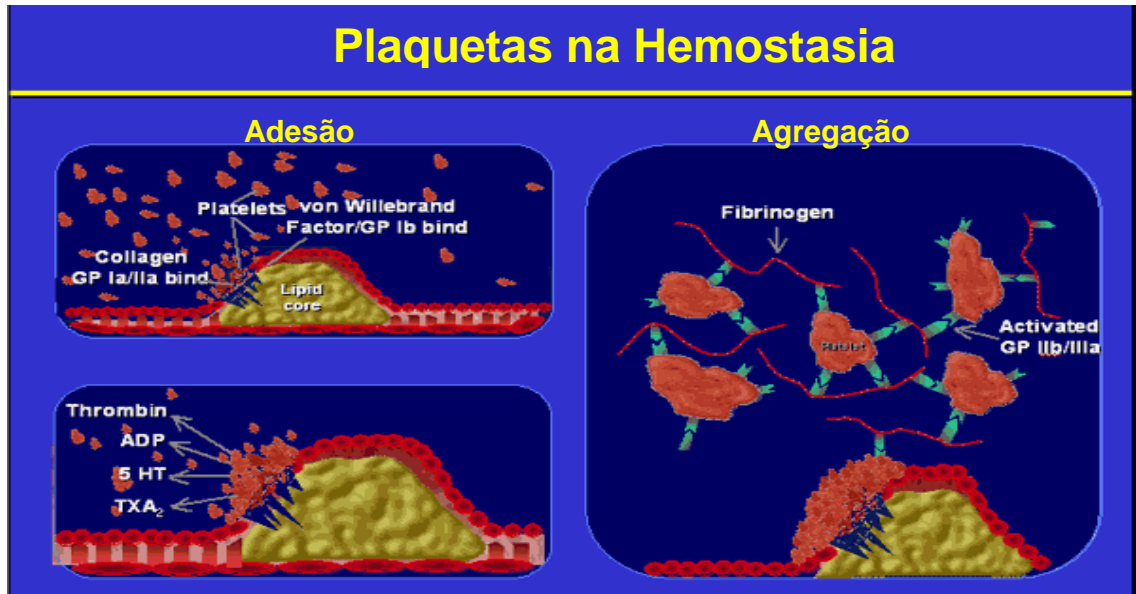


Figura 1. Papel das plaquetas no processo hemostático. Adesão, ativação e agregação plaquetária
 Fonte: Kumar e Hermann, 1997, adaptado.

O que hoje chamamos de hemostasia secundária foi proposto no ano de 1960 como o conhecido modelo da cascata da coagulação didaticamente representada por duas vias, a extrínseca (rápida) e a intrínseca (lenta). Hoje, porém, já se tem conhecimento que as duas vias não funcionam independentemente e em paralelo, como se imaginava (Hoffman e Monroe, 2007). O novo modelo do processo de coagulação está dividido em três fases: iniciação, propagação e formação do coágulo (Figura 2).

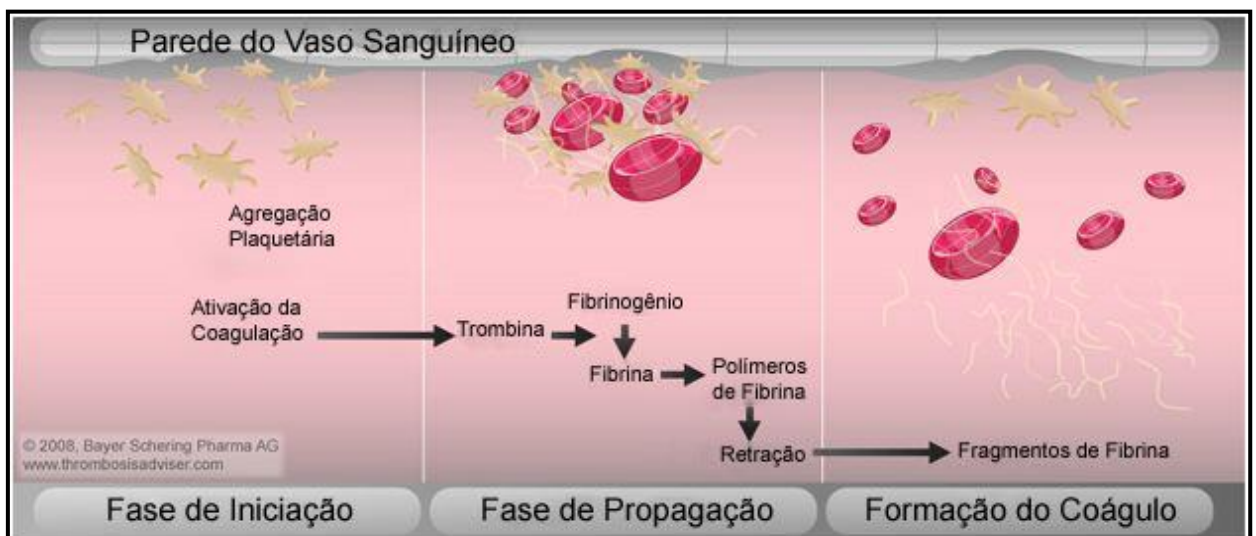


Figura 2. Representação esquemática da coagulação sanguínea. Papel das plaquetas no processo hemostático.
 Fonte: Adaptado de Bayer Schering Pharma AG, 2008.

A fase de iniciação se dá após o dano vascular, onde as células liberam o Fator Tecidual (FT) e este se complexa com o Fator VII (FVII) ativando-o, seguido da ativação de outros fatores. O complexo TF - FVIIa, na presença de cálcio, ativa os FIX e FX (Broze, 1995). O FXII é então ativado pela calicreína e converte o FXI em FXIa. A resposta do ativador do FXI dá início a formação do complexo-tenase, que consiste dos FIXa, FVIIIa e fosfolipídeos, que por sua vez promove a ativação do FX em FXa. O complexo protrombinase ativado (que envolve o FXa e co-fatores) é responsável durante a fase de propagação, pela conversão de protrombina na enzima multifuncional trombina (Hoffman e Monroe, 2007).

A trombina faz a conversão do fibrinogênio (proteína solúvel) em fibrina (estruturas insolúveis). O FXIII ativado pela trombina estabiliza o coágulo ao se ligar a fibrina que capta e retém componentes celulares do coágulo (plaquetas e/ ou glóbulos vermelhos (Colman et al., 2006).

Para equilíbrio da hemostasia a dissolução do coágulo de fibrina é acarretada pelo processo denominado fibrinólise. O plasminogênio plasmático é o precursor da plasmina, essa conversão é feita pela liberação do ativador tecidual de plasminogênio (t-PA) presente no endotélio. No processo fibrinolítico, a plasmina, tem ação proteolítica capaz de clivar vários fatores de coagulação, inclusive o fibrinogênio. A atividade proteolítica da plasmina sobre a fibrina ou fibrinogênio leva à dissolução do coágulo (Colman et al., 2006).

1.2 Plaquetas e glicoproteínas de membrana

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados em forma discóide presentes no sangue, produzidos a partir de megacariócitos na medula óssea. Das plaquetas presentes no organismo, 70% são encontradas circulantes no sistema sanguíneo e os outros 30% encontram-se no baço. Após aproximadamente dez dias na circulação sanguínea, as plaquetas são retiradas pelas células reticuloendoteliais do baço e do fígado (Schulze e Shivdasani, 2005).

As plaquetas possuem uma estrutura discóide complexa, sendo divididas em quatro zonas (Figura 3).



Figura 3. Plaqueta: Zonas e principais estruturas.
 Fonte: Castro et al., 2006

A) Zona Periférica: esta zona compreende as membranas internas e externas, que são ricas em glicoproteínas que agem como alvos para a reação de adesão e receptores desencadeando a agregação plaquetária, e os fosfolípidos utilizados como substratos para a produção de ácido araquidônico e conseqüentemente de tromboxano A2 (TXA2) que é um potente agonista da agregação plaquetária. Está presente também na zona periférica o sistema canicular aberto (SCA), onde através dele ocorrem as trocas de moléculas com o meio externo, incluindo a significativa liberação de moléculas após a ativação plaquetária (Hartwig, 2002).

B) Zona Sol-Gel: se encontra abaixo da zona periférica é composta pelo citoesqueleto, que sustenta a forma discóide da plaqueta e que no evento de ativação plaquetária parece orientar a centralização dos grânulos para a liberação pelo sistema canicular, e pelo sistema contrátil, que sob ativação orienta a mudança da forma discóide, prolongamento dos pseudópodes, contração interna e liberação dos constituintes granulares (Hartwig, 2002).

C) Zona de organelas: constituída pelos grânulos alfa, grânulos densos e componentes celulares. Os grânulos alfa contêm proteínas adesivas, como fator de Von Willebrand (FvW), trombospondina, vitronectina, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator IV plaquetário, fatores da coagulação (ex: fator XI) e inibidor do

ativador plasminogênio. Os grânulos densos contêm trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), serotonina, cálcio e componentes celulares, tais como lisossomos e mitocôndria, que além de conter ATP e ADP também participam dos processos metabólicos da plaqueta e armazenam enzimas e outras moléculas críticas para a função plaquetária (Hartwig, 2002; Flaumenhaft, 2003).

D) Sistema membranar: inclui o sistema tubular denso, onde se encontra o cálcio utilizado para desencadear os eventos contráteis e os sistemas enzimáticos, envolvidos na produção de síntese de prostaglandinas (Hartwig, 2002).

As plaquetas têm um papel fundamental no controle na hemostasia, elas participam do processo hemostático aderindo-se à superfície subendotelial exposta por meio da ligação das glicoproteínas da sua membrana, tendo como participante indispensável uma proteína plasmática, o FvW, entre outros receptores, secretando constituintes indispensáveis a hemostasia e formando um agregado plaquetário como pode ser visualizado na figura 4 (Jackson et al., 2000; Castro et al., 2006).

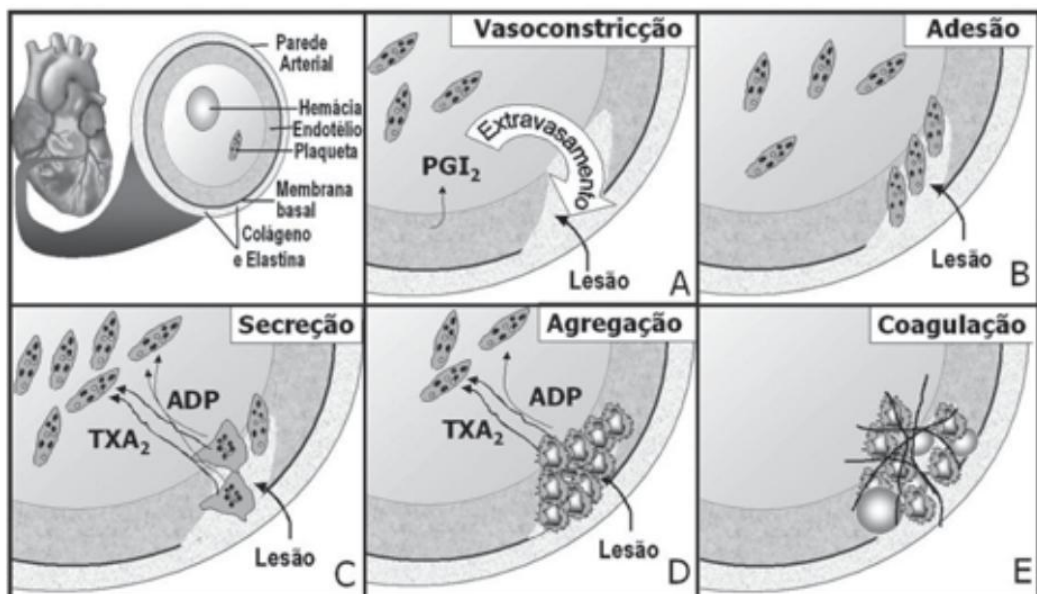


Figura 4. Participação das plaquetas no processo de hemostasia durante a formação do tampão. (A) processo de injúria (lesão) com exposição de agonistas plaquetários; (B) adesão das plaquetas ao subendotélio; (C) mudança de forma da plaqueta com secreção dos grânulos; (D) ligação plaqueta/plaqueta; (E) depósito da fibrina sobre o tampão plaquetário.

Fonte: Castro et al., 2006.

A camada mais externa da plaqueta, o glicocálice, é rica em glicoproteínas, contendo mais de 100 proteínas que são responsáveis pelo controle da função plaquetária incluindo ativação plaquetária, adesividade, sinalização inter e

intracelular e agregação para adsorção e concentração dos fatores plasmáticos, acelerando a coagulação, resultando na formação de fibrina responsável pela hemostasia secundária, que reforçará o tampão plaquetário (Valentin e Newman, 1994; Castro et al., 2006).

Na década de 70 definiu-se a existência de três glicoproteínas na membrana plaquetária denominadas GP I, II e III (Phillips, 1972; Nachman e Ferris, 1972; Nurden e Caen, 1975), em ordem decrescente de massa molecular, utilizando técnicas de baixo poder de resolução. Posteriormente, com técnicas mais avançadas, outras glicoproteínas foram descritas (Nurden, 1994).

De forma geral as glicoproteínas da membrana plaquetária pertencem a cinco famílias distintas: glicoproteínas ricas em leucinas, família das integrinas, família das imunoglobulinas; família das selectinas e a família dos receptores com domínios transmembrânicos (Nurden, 1994).

A família das integrinas compreende os receptores conhecidos como antígenos VLA (*very late antigens*) e os receptores de citoadesão que incluem o complexo IIb/IIIa e o receptor para vitronectina (VnR) (Tabela 1). Esses antígenos foram descritos inicialmente em linfócitos T (Hemler et al., 1985; Arnaout, 1990). As plaquetas contêm os VLA-2, VLA-5 e VLA-6 (Hemler et al., 1988).

Tabela 1 - Receptores de adesão plaquetária humana.

Receptores glicoprotéicos	Subunidades	CD
GP IIb/IIIa	GP IIb/ (α 2b)	CD41
	GP IIIa (β 3)	CD61
GPIa/IIa (α 2 β 1)	GPIa (α 2)	CD49b
	GPIIa (β 1)	CD29
GPIb/IX/V	GPIb α	CD42b
	GPIb β	CD42c
	GPIX	CD42a
	GPV	CD42d
GPVI	GPVI	--
GPIV	GPIV	CD36

O complexo glicoproteico Ib-IX-V pertence à família de glicoproteínas ricas em leucinas e é o receptor responsável pela adesão das plaquetas não ativadas ao FvW, ligado ao subendotélio dos vasos lesados. Este complexo é formado por 4 cadeias: GPIb α (CD42b, 150 kDa) e GPIb β (CD42c, 27 kDa) ligadas por ponte dissulfeto; GPIX (CD42a, 22 kDa) ligada por interação não covalente forte ao heterodímero GPIb na razão 1:1 e a GPV (CD42d, 82 kDa) ligada por interação não covalente fraca ao heterodímero GPIb na razão 1:2 (GPV: GPIb), como pode ser visualizado na Figura 5. Todas as cadeias do complexo GPIb-IX-V possuem repetições ricas em leucinas (Ruggeri, 1991; Roth, 1991; Kobe e Deisenhofer, 1994; Clemetson e Clemetson, 1995; Andrews et al., 1997; Lopez et al., 1998; Bernedt et al., 2001; Ware e Ruggeri, 2001).

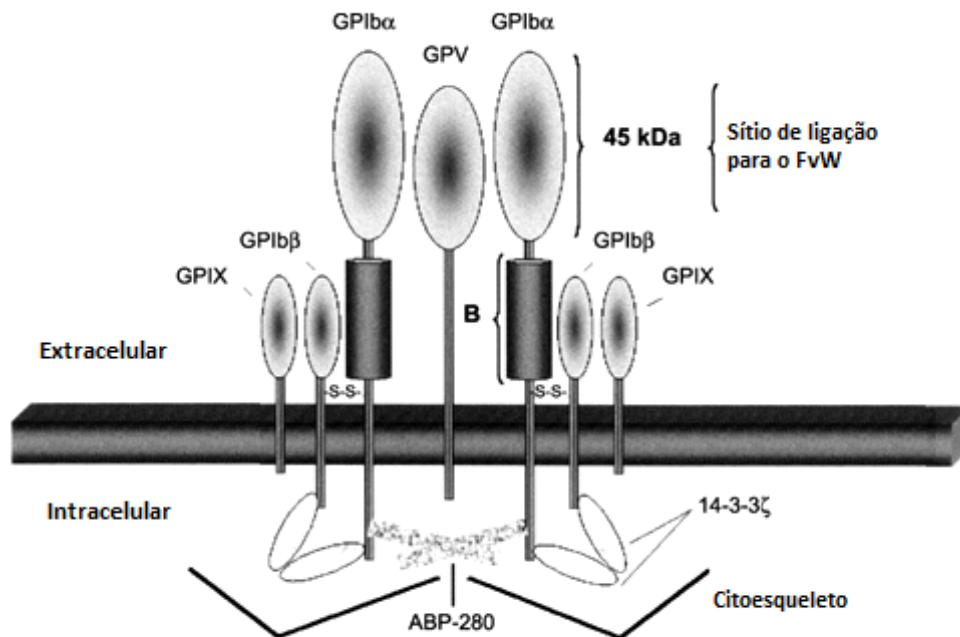


Figura 5. Esquema do complexo GPIb-IX-V indicando a interação das subunidades na formação do complexo
Fonte: Adaptado de Ware e Ruggeri, 2001.

A integrina $\alpha 2\beta 1$ (GP Ia/IIa, VLA-2, representadas pelos anticorpos CD49b e CD29, respectivamente) é um receptor universal para o colágeno tipo I e está presentes em leucócitos, fibroblastos, células endoteliais e células carcinomatosas (Pischel et al., 1988). Colágeno dos tipos I, III, IV, V, VI e laminina também se

ligam a este receptor de maneira dose-dependente. Este complexo se liga ao colágeno fibrilar desencadeando a ativação e secreção plaquetária. Essa integrina é um heterodímero formado por uma subunidade α que possui o domínio I, que possui homologia com o domínio A do FvW e com proteínas da matriz cartilaginosa, sugerindo sua associação com a ligação ao colágeno (Roth, 1991; Kamata et al., 1994). A expressão desta integrina em relação as outras varia em até uma ordem de magnitude, correlacionada positivamente com a rapidez na fase inicial da adesão das plaquetas ao colágeno e mesmo em estado de baixa afinidade é capaz de mediar a adesão plaquetária ao colágeno (Ruggeri e Mendolicchio, 2007).

A Glicoproteína IIIb, também conhecida por GPIV (CD36), é a principal proteína encontrada na membrana plaquetária, representando entre 10-15% das proteínas totais. É expressa por diversos tipos celulares como megacariócitos, monócitos, reticulócitos, eritrócitos fetais e células endoteliais microvasculares. Esta glicoproteína medeia a interação da plaqueta com colágeno, porém, foi descrito que células deficientes dessa glicoproteína tiveram a mesma capacidade de ligação com colágeno e trombospondina (Sugiyama et al., 1987; Nieswandt e Watson, 2003).

A Glicoproteína VI é expressa apenas em plaquetas e megacariócitos descrita como um receptor plaquetário para o colágeno. Faz parte da superfamília das imunoglobulinas que contem dois domínios C2 tipo imunoglobulina. Esta glicoproteína é considerada indispensável para a interação do colágeno com as plaquetas e sugere-se que esteja ativa somente com colágeno fibrilar e não com colágeno solúvel (Moroi et al., 1989). A interação da GPVI com o colágeno durante a adesão plaquetária leva a uma cascata que culmina com o aumento do cálcio citoplasmático e a conseqüente mudança do citoesqueleto, que, por sua vez, leva a mudança conformacional do complexo GPIIb/IIIa (Surin, 2008).

O complexo GPIIb/IIIa (também conhecido como $\alpha_{IIb}\beta_3$) é um heterodímero formado pelas unidades α_{IIb} (GPIIb - CD41b) e β_3 (GPIIIa – CD61) das integrinas. Estas subunidades são sintetizadas de forma separadas e são complexadas no interior do retículo endoplasmático. A ativação plaquetária causa uma mudança conformacional nesse complexo, tornando-o apto a se ligar a diferentes compostos, como o fibrinogênio, o FvW, a fibronectina, e o vitronectina. Funcionando, assim, como receptor dependente de ativação que reconhece determinadas seqüências de

aminoácidos que apresentam propriedades adesivas encontrado em numerosas proteínas adesivas (Phillips et al., 1988).

A P-selectina (CD62P) é um membro da família das selectinas é uma glicoproteína de membrana encontrada tanto nos grânulos alfa das plaquetas como nos corpúsculos de Weibel-Palade das células endoteliais. Essas moléculas contém um domínio N-terminal semelhantes à lectina, um domínio semelhante ao fator de crescimento epidérmico, um número variável de repetições de consenso de uma seqüência encontrada nas proteínas reguladoras do sistema complemento, um domínio transmembrana e uma curta cauda citoplasmática. Após a ativação celular por agonistas, como a trombina, histamina e ionóforo de cálcio, a P-selectina é rapidamente redistribuída para a superfície celular, ligando-se a estruturas expressas nos neutrófilos e monócitos por meio de um mecanismo dependente de cálcio, semelhante ao da lectina. Assim, a P-selectina medeia as interações entre plaqueta-plaqueta, plaqueta-subendotélio e com leucócitos (Blann e Lip, 1997; Michelson e Furman, 1999; Venturinelli et al., 2006).

A ativação e agregação plaquetária não ocorre em condições normais nos vasos sanguíneos. Porém, diante de uma lesão na parede vascular, há exposição do tecido subendotelial, e conseqüentemente dos ligantes fibronectina, laminina, colágeno e FvW que entram em contato com o sangue e fatores que impedem a ativação plaquetária, como Óxido Nítrico (NO) e prostaglandinas (PGI₂), deixam de ser produzidos (Jackson et al., 2000).

O modelo de adesão sugere que esta ocorra pela interação das plaquetas circulantes ao FvW ligado ao colágeno e através da glicoproteína GPIb-IX-V. A estabilização do processo é mediada pelo FvW, glicoproteína adesiva que permite as plaquetas manterem-se aderidas a parede vascular mesmo sujeitas a forças contrárias do lúmem vascular. O FvW forma uma ponte entre as fibras de colágeno da parede vascular e receptores situados nas glicoproteínas GPIb-IX-V. Seguido de sua ligação por meio do complexo GPIb-IX-V, a plaqueta se liga ao colágeno por meio da integrina $\alpha 2\beta 1$, firmando assim, a adesão. Após a estabilização da adesão, a glicoproteína GPVI interage com o colágeno, realizando assim a mediação da adesão, e inicia a ativação e agregação plaquetária com as superfícies trombogênicas (Hickey et al., 1989; Ruggeri, 1991; Sixma et al., 1997; Barnes et al., 1998; Santoro, 1999).

Como mencionado o colágeno ligado ao FvW interage com as plaquetas através do complexo GPIb-IX-V e a integrina $\alpha 2\beta 1$, porém, isso ocorre de diferentes formas dependendo da tensão de cisalhamento. Em alta tensão de cisalhamento ocorre a interação ao colágeno - FvW através do complexo GPIb-IX-V e, posteriormente, é ativado pela ligação ao GPVI sob fluxo. Por outro lado, em condições de baixo cisalhamento a ligação ocorre pela integrina $\alpha 2\beta 1$ seguida pela ligação ao receptor GPVI, e ativação. GPIV e GPIb-IX-V podem se ligar ao colágeno sem prévia ativação, enquanto $\alpha 1\beta 3$ e $\alpha 2\beta 1$ requerem algum nível de ativação antes de expor os sítios de ligação ao FvW e colágeno (Surin, 2008).

O evento de ativação leva as plaquetas a mudanças significativas em sua forma. Ocorre a ativação da integrina $\alpha 1\beta 3$ que permite a interação plaqueta-plaqueta pela ligação do fibrinogênio com as integrinas $\alpha 1\beta 3$ ativadas, sinalizando para a formação de agregados mais estáveis que formam o tampão plaquetário no local da ruptura do vaso. A membrana também produz pseudópodes alongados que tornam as plaquetas extremamente adesivas. Liberam agonistas secundários como ADP, TXA₂, serotonina, proteínas envolvidas na adesão como fibrinogênio e P-selectina, após sua ativação. O evento seguinte é a adesão de novas plaquetas ao local da injúria seguido da agregação. A ação das plaquetas, juntamente com a ativação da cascata de coagulação e conseqüentemente formação do coágulo de fibrina, é responsável por cessar a hemorragia (Schimitz et al., 1998; Kamiguti, 2005).

1.3 Plaquetas e doenças tromboembólicas

As plaquetas desempenham um papel importante nas doenças tromboembólicas e a terapia antiplaquetária assim continua a ser crucial no tratamento e profilaxia. Embora a formação do tampão controlada seja necessária para a prevenção da perda excessiva de sangue e para promover a cicatrização de feridas, várias condições patológicas podem resultar na formação de trombos oclusivos levando a complicações clínicas graves, incluindo infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral isquêmico (De Meyer et al., 2008).

Está bem estabelecido que a formação de trombo rico em plaquetas desempenha um papel importante no aparecimento e progressão da hipertensão

arterial e distúrbios trombóticos e, portanto, que a terapia antiplaquetária é a base do tratamento e profilaxia. Considerando o processo normal das plaquetas na hemostasia, onde estas formam agregado sobre a lesão no vaso sanguíneo, ocorre a adesão de plaquetas na superfície do endotélio em lesões, quando ocorre a ruptura das placas ateroscleróticas, este evento também pode conduzir a formação de um tampão plaquetário oclusivo. Além disso, o papel fisiopatológico de plaquetas na aterosclerose está bem estabelecido (Langer e Gawaz, 2008).

1.4 Drogas que interferem na atividade plaquetária

As vias de adesão plaquetária vinculadas ao colágeno podem ser importantes para o desenvolvimento de fármacos antiagregantes plaquetários, especialmente devido ao baixo número de possíveis interações por essa via já descritas (De Meyer et al., 2008).

Além disso, a necessidade específica da interação GPIIb-IX-V - FvW em condições de alto cisalhamento pode fazer do sistema arterial um alvo sem interferir no sistema venoso, o que provavelmente reduz riscos de problemas com sangramento, sendo este o efeito colateral mais importante no momento de uso da drogas antiagregantes. (Vanhoorelbeke et al., 2003)

Observando a última década, nota-se que houve um grande progresso no desenvolvimento de drogas antitrombóticas, que podem ser classificadas em 3 categorias principais: anticoagulantes, antiplaquetários e trombolíticos. O aumento no entendimento do processo trombolítico e desordens vasculares ajudaram os pesquisadores a apontar caminhos singulares envolvendo sistemas de coagulação, trombolítico, fibrinolítico além dos sistemas envolvendo integrinas. Tradicionalmente Aspirina e a Heparina não fracionada são usadas em casos de infarto do miocárdio. No entanto, novos agentes antiplaquetários tais como, Clopidogrel, inibidores de glicoproteína IIb/IIIa, Heparina de baixa massa molecular, além de inibidores de trombina e vários outros agentes têm sido introduzidos na clínica (Chakrabarti e Das, 2007).

Hoje drogas antiplaquetárias como a aspirina, Tienopiridinas e Clopidogrel são utilizadas na prevenção de eventos vasculares em pacientes. Essas drogas diminuem a agregação plaquetária por vias diferentes, a Aspirina inibe a formação

do tromboxano A₂, e a Tienopiridina inibe um receptor de ADP (P₂Y₁₂) (Drouet et al., 2010).

Drogas que interferem na adesão de plaquetas teriam a vantagem adicional de reduzir a ativação plaquetária e a secreção de outros fatores, que podem ser benéficas na prevenção da constrição. Vários antagonistas de adesão de plaquetas têm sido descritos, bloqueando a função de um GPIb, GPVI ou a integrina $\alpha 2\beta 1$, fortemente envolvidos na adesão (Vanhoorelbeke et al., 2003).

A aterosclerose é um exemplo de doença ligada diretamente com a plaqueta, pois esta afeta a circulação coronária, cerebral e periférica onde ocorrem processos inflamatórios em grande parte pelo acúmulo de lipídios. Sendo a plaqueta um mediador fundamental não só da coagulação, mais também de várias respostas como a endotelial, imunológica e trombótica, é considerada assim uma peça-chave na iniciação, progressão, e controle da aterosclerose (Buch et al., 2010).

1.5 Hematofagia e sanguessugas

A hematofagia está presente em mais de 14 mil espécies de artrópodes, sanguessugas, nematóides e mamíferos. Para o sucesso em sua alimentação, os animais precisam bloquear as defesas hemostáticas do hospedeiro produzindo antagonistas que serão injetadas através da saliva. De acordo com a teoria evolutiva, a hematofagia tem origem polifilética, onde esses animais desenvolveram um grande repertório de substâncias capazes de interferir em diferentes etapas do mecanismo de coagulação sanguínea e fibrinólise como adaptações ao meio, resultando em uma convergência evolutiva (Ribeiro, 1995; Koh e Kini , 2009).

Existem diferentes grupos de animais hematófagos; no filo dos mamíferos encontramos os morcegos vampiros (*Desmodus rotundus*), dentro do grande grupo dos artrópodes temos diversos mosquitos, moscas, barbeiros e carrapatos. No filo Nematódeo encontramos os vermes ancilostomas, responsáveis pela doença conhecida como amarelão e no filo Annelida encontramos as sanguessugas (Ciprandi et al., 2003).

Aproximadamente 75% das espécies de sanguessugas são hematófagas e muitas delas podem ingerir de duas a três vezes o valor de sua própria massa

corpórea em sangue, em uma única refeição. Esse material pode levar até seis meses para ser digerido e uma refeição pode ser armazenada por até um ano e meio (Villemet et al., 1988).

A espécie de sanguessugas *Haementeria depressa* (*H. depressa*), indicada na figura 06, é principalmente encontrada na região sul do Brasil, em açudes e rios de curso lento, sempre em locais em que gados e eqüinos utilizam para saciar a sede, animais que costumam ser seus hospedeiros preferenciais.



Figura 6. (A) Espécime de *Haementeria depressa*; (B) Dissecção do complexo salivar de *H. depressa* (gp: glândula posterior; ga: glândula anterior; pb: probóscide).
Fonte: Faria, 2004.

As sanguessugas são classificadas no Filo Annelida, por ter seu corpo composto de muitos segmentos ou metâmeros, e classificada na classe Hirudinea, no qual temos o grupo composto de sanguessuga, com as características marcantes da classe como corpo pigmentado, ventosa posterior grande e freqüentemente uma menor na extremidade anterior, 34 segmentos subdivididos, monóicas (presença dos órgãos sexuais dos dois sexos), celoma preenchido por tecido conjuntivo e músculos, ovos usualmente em casulo, sem larvas, presença em água doce ou salgada ou na terra, apresentando cerca de 500 espécies (Storer, 2003).

Dentro da classe Hirudinea, temos três ordens: Acanthobdellida, que não possuem ventosas na porção anterior, probóscide (apêndice alongado do canal alimentar) ou mandíbula, dois pares de cerdas em cada um dos segmentos II-IV, encontrado na Sibéria, Rússia e Finlândia. As sanguessugas da ordem Gnathobdellida não possuem probóscide e usualmente com três mandíbulas quitinosas e sangue vermelho, inclui a maioria das sanguessugas, e tem como exemplo a *Hirudo medicinalis*. E a ordem Rhynchobdellida, possui uma probóscide protáctil, ausência de mandíbulas e sangue incolor (Storer, 2003).

A sanguessuga *H. depressa* é classificada dentro dessa última ordem (Figura 07), na família Glossiphonia, caracterizada por serem predadoras e ectoparasitas no gênero Haementeria (Storer, 2003).

Reino	<i>Animalia</i>
Filo	<i>Annelida</i>
Classe	<i>Hirudinea</i>
Ordem	<i>Rhynchobdellida</i>
Família	<i>Glossiphonia</i>
Subfamília	<i>Haementeriinae</i>
Gênero	<i>Haementeria</i>
Espécie	<i>Haementeria depressa</i>

Figura 07. Classificação sistemática da sanguessuga *Haementeria depressa*
Fonte: Ruppert, 1996.

As sanguessugas, assim como outros organismos hematófagos, possuem em sua saliva um extenso repertório de fatores bioquímicos capazes de agir para manutenção do sangue ingerido no estado líquido, substâncias capazes de interferir no mecanismo da coagulação sangüínea e agregação plaquetária, tornando o sangue incoagulável, processo este indispensável para benefício de sua alimentação.

Algumas substâncias provenientes destes animais e que interferem na coagulação sangüínea, agregação plaquetária e/ou fibrinólise têm sido caracterizadas ao longo dos anos (Tabela 2) (Tuszynski et al., 1987; Condra et al.,

1989; Chudzinski-Tavassi et al., 1998; Faria et al., 1999; Salzet, 2001; Chudzinski-Tavassi et al., 2003). A figura 8 demonstra as diferentes vias do Sistema Hemostático e alguns pontos onde componentes provenientes de sanguessugas têm seu papel definido através de estudos e caracterizações de atividade.

Tabela 2 - Substâncias provenientes de sanguessugas, ações biológicas.

Sanguessuga	Substância	Ação Biológica
<i>Hirudo medicinalis</i> (mandibulada)	Calina (Munro et al., 1991)	Inibidor de agregação plaquetária
	Hirudina (Markwardt, 1957)	Inibidor de trombina
	Bdelina (Krejci e Fritz, 1976;)	Inibidor de tripsina e plasmina
	Bdelestasina (Moser et al., 1998)	Inibidor de tripsina e plasmina
	Destabilase (Baskowa e Nikonov, 1985)	Fibrinolítico
	LDTI (Sommerhoff et al., 1994)	Inibidor de tripsina e quimotripsina
	Hirustasina (Söllner et al., 1994)	Inibidor de trombina, quimotripsina, tripsina, catepsina G e calicreína
<i>Hirudo nipponia</i> (mandibulada)	HmIL-16 (Croq et al., 2010)	Homóloga a Interleucina 16 humana
	Granulina (Hong e Kang, 1999)	Inibidor de trombina
	Guamerina I (Jung et al., 1995)	Inibidor de elastase
<i>Hirudinaria manillensis</i> (mandibulada)	Piguamerina (Kim e Kang, 1998)	Inibidor de calicreína e tripsina
	Bufrudina (Electricwala et al., 1991)	Inibidor de trombina
<i>Hirudo sylvestrus</i> (mandibulada)	Hirullin (Steiner, et al., 1992)	Inibidor de trombina
	Haemadina (Strube et al., 1993)	Inibidor de trombina
<i>Whitmania endulata</i> (mandibulada)	Guamerina II (Kim et al., 1996)	Inibidor de elastase
<i>Macrobdeella decora</i> (mandibulada)	Decorsina (Mazur et al., 1991; Krezel et al., 2000)	Inibidor de agregação plaquetária (via GPIIb/IIIa)
<i>Haementeria officinalis</i> (probóscide)	Antistasina (Tuszynski et al., 1987)	Inibidor de FXa
	LAPP (Connolly et al., 1992)	Inibidor de agregação plaquetária (via colágeno)
<i>Haementeria ghilianii</i> (probóscide)	Ghilanten (Blankenship et al., 1990)	Inibidor de FXa
	Hementina (Swadesh et al., 1990)	Fibrino(geno)lítico
	Tridegina (Seale et al., 1997)	Inibidor de FXIIIa
<i>Placobdella ornata</i> (probóscide)	Ornatina (Mazur et al., 1991)	Inibidor de agregação plaquetária (via GPIIb/IIIa)
<i>Theromyzon tessulatum</i> (probóscide)	Citina (Chopin et al., 1997)	Inibidor de quimotripsina
	Tessulina (Chopin et al., 1998B)	Inibidor de quimotripsina e tripsina
	Therina (Chopin et al., 1998A)	Inibidor de tripsina
	Theromina (Salzet et al., 2000)	Inibidor de trombina
	Therostasina (Chopin et al., 2000)	Inibidor de FXa
<i>Haementeria depressa</i> (probóscide)	Lefaxin (Faria et al., 1999)	Inibidor de FXa
	Hementerina (Chudzinski-Tavassi et al., 1998; 2003)	Fibrino(geno)lítico e inibidor de agregação plaquetária (via nitridérgica)
<i>Limnatis nilotica</i> (probóscide)	Fasin (Bruin et al., 2005)	Inibidor de FXa

Fonte: Faria, 2004 atualizada.

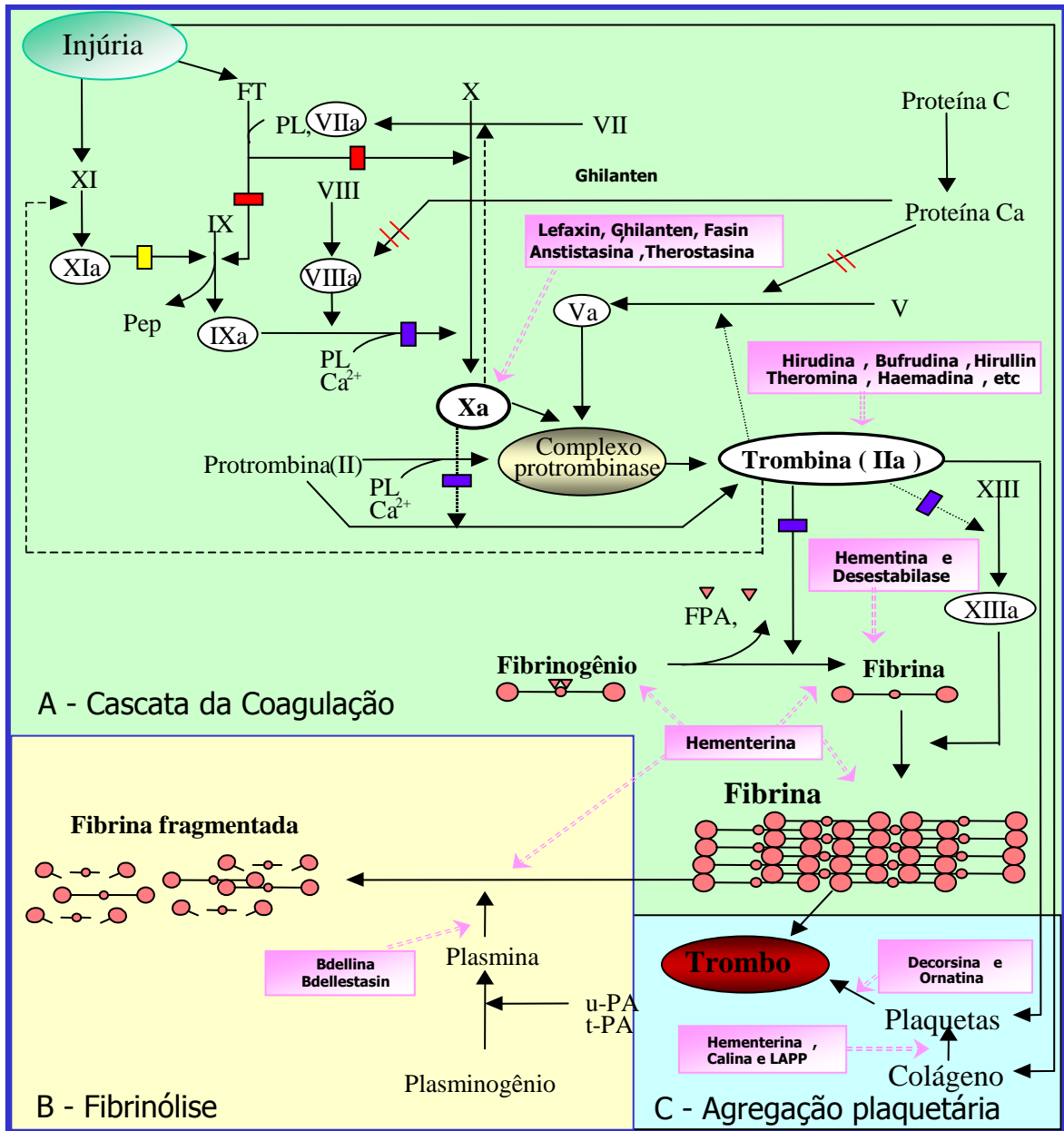


Figura 8. Moléculas provenientes de sanguessugas e sua ação no sistema Hemostático
 Fonte: Adaptado de Faria, 2004.

1.6 Estudos com *Haementeria depressa*

Estudos com diversos hematófagos mostram um grande número de anticoagulantes e inibidores de plaquetas avaliados *in vivo*, tanto em testes de estágios de desenvolvimento pré-clínico como clínico. A especificidade e potência única desses antitrombóticos provenientes de parasitas, faz deles produtos com grande promessa no tratamento de uma variedade de doenças humanas incluindo as doenças do coração, infarto e câncer (Ledizet et al., 2005).

No caso das sanguessugas *H. depressa*, foram purificadas e caracterizadas duas proteínas nativas provenientes de seus complexos salivares (Figura 06B), por técnicas de bioquímica clássica, sendo elas: um inibidor de FXa denominado Lefaxin (*Leech factor Xa inhibitor*) (Faria, 1999; Faria et al., 1999); uma metaloproteinase denominada Hementerina com ação fibrino(geno)lítica (Chudzinski-Tavassi et al., 1998) e inibidora da agregação plaquetária pela via nitridérgica (Chudzinski-Tavassi et al., 2003).

Sabe-se por estudos prévios (*dados não publicados*), que o extrato bruto dos complexos salivares de *H. depressa* possui atividade inibitória na agregação plaquetária quando esta é induzida por diferentes agonistas. No entanto, o único inibidor de agregação plaquetária descrito para esta sanguessuga foi a Hementerina, que por sua vez age pela via nitridérgica (Chudzinski-Tavassi et al., 2003), porém a agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas dá indícios de que devam existir demais substâncias que inibam este sistema também por outras vias.

Além disso, analisando o rico perfil de compostos com provável envolvimento na alimentação do hematófago apresentado na análise transcriptômica dos complexos salivares de sanguessugas *H. depressa* (Tabela 3), acredita-se que o animal deva se servir de alguns mecanismos para promover com sucesso sua alimentação à base de sangue de seus hospedeiros sem que o mesmo coagule durante o processo, cercando-se assim de diferentes estratégias para manutenção da fluidez sangüínea.

Tabela 3 - Lista dos clones completos na biblioteca com provável envolvimento no processo de alimentação de sanguessugas *H. depressa*. Circulados em vermelho estão os transcritos similares ao LAPP da *H. officinalis*

Família #	Clone@Cluster	Identificação por melhor alinhamento em NR database ^a / [Organismo]	T O ^h	Nº de acesso em NR database ^b	e value ^c	Identificação de domínio em CDD ^d	e value ^c	MM ^e	PS ^f	MM ^g	pI
1	H06A09@HDEP0059c	leech antiplatelet prot prec [<i>Haementeria officinalis</i>]	S	pir A42435	1e-023	smart00473, subfamily of APPLE domains	0.001	15.2	21	12.8	3.96
	H06A02@HDEP0318s	leech antiplatelet prot prec [<i>Haementeria officinalis</i>]	S	pir A42435	4e-074			15.7	21	13.4	3.94
	L02F02@HDEP0545s	leech antiplatelet prot prec [<i>Haementeria officinalis</i>]	S	pir A42435	3e-048			15.7	21	13.4	4.09
2	H01D09@HDEP0121s	theromacin [<i>Theromyzon tessulatum</i>]	S	gb AAR12065.1	3e-017			9.7	21	8.6	9.77
	H05B07@HDEP0285s	theromacin [<i>Theromyzon tessulatum</i>]	S	gb AAR12065.1	7e-026	pfam03259, Roadblock/LC7 domain	3e-05	10.9	22	8.5	8.99
	H10A03@HDEP0385s	theromacin [<i>Theromyzon tessulatum</i>]	S	gb AAR12065.1	2e-026			10.8	22	8.5	8.49
	H11F06@HDEP0458s	theromacin [<i>Theromyzon tessulatum</i>]	S	gb AAR12065.1	7e-026			11.1	23	8.6	9.77
3 ⁱ	H06B03@HDEP0060c	tridegin [<i>Haementeria ghilianii</i>]	S		2e-034			9.49	18	7.49	6.74
	H11F05@HDEP0457s	tridegin [<i>Haementeria ghilianii</i>]	S		1e-034			9.36	17	7.49	6.74
	L01B11@HDEP496s	tridegin [<i>Haementeria ghilianii</i>]	S		2e-034			9.49	18	7.49	6.74
	L01B12@HDEP497s	tridegin [<i>Haementeria ghilianii</i>]	S		1e-028			10.12	18	8.11	5.70
	L01C01@HDEP498s	tridegin [<i>Haementeria ghilianii</i>]	S		1e-033			9.39	17	7.49	6.74
4	H01C09@HDEP0007c	therostasin precursor [<i>Theromyzon tessulatum</i>]	S	sp Q9NBW4	1e-030				24	11.6	4.74
5	H06F05@HDEP0338s	protease inhibitor [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	O	ref NP_030435.1	8e-012	pfam00280, potato_inhibit	2e-16	9.7	20	7.6	9.01
6	L02B10@HDEP0022c	hypothetical protein [<i>Streptomyces avermitilis</i>]	O	ref NP_823881.1	4e-021			15.5	20	13.2	9.4
7	H10C07@HDEP0031c	myohemerythrin [<i>Theromyzon tessulatum</i>]	S	sp Q9GYZ9	2e-034	pfam01814, Hemerythrin	2e-20	13.0	-	13.0	5.58
	L01D05@HDEP0098c	myohemerythrin [<i>Theromyzon tessulatum</i>]	S	sp Q9GYZ9	3e-033	pfam01814, Hemerythrin	3e-28	13.8	-	13.8	6.00
	H04G06@HDEP0269s	myohemerythrin [<i>Theromyzon tessulatum</i>]	S	sp Q9GYZ9	8e-032	pfam01814, Hemerythrin	3e-22	12.6	-	12.6	8.84
	H05G04@HDEP0312s	myohemerythrin [<i>Theromyzon tessulatum</i>]	S	sp Q9GYZ9	1e-034	pfam01814, Hemerythrin	7e-26	15.7	16	14.0	6.03
	H11B06@HDEP0435s	myohemerythrin [<i>Theromyzon tessulatum</i>]	S	sp Q9GYZ9	6e-036	pfam01814, Hemerythrin	6e-29	13.9	-	13.9	5.80
	H11C02@HDEP0438s	myohemerythrin [<i>Theromyzon tessulatum</i>]	S	sp Q9GYZ9	1e-035	pfam01814, Hemerythrin	5e-29	13.9	-	13.9	6.00

Fonte: Faria, 2004

A partir da análise transcriptômica dos componentes dos complexos salivares de *H. depressa*, foi construído um banco de EST (*expressed sequence tags*), pioneiro para este tecido de sanguessugas, a partir do qual cerca de 900 seqüências foram depositadas no dbEST do GenBank (CN807918 a CN807028) (Faria et al., 2005). Através desta análise verificou-se que 10,6% dos transcritos apresentam a seqüência do peptídeo sinal o que possivelmente correspondem as proteínas secretadas para saliva. Entre estes transcritos cerca de 10% são isoformas similares a uma proteína denominada LAPP (Connolly et al., 1992), com variação de 45% a 94% na similaridade com este agente antiplaquetário, suas massas moleculares e pls preditos são próximos aos do próprio LAPP (Figura 9). Além disso, tais seqüências estão entre as mais abundantes na biblioteca de cDNA do tecido do complexo salivar da sanguessuga (Tabela 4), demonstrando sua grande importância no processo de alimentação do hematófago.

Paralelamente a análise transcriptômica dos complexos salivares desta sanguessuga, uma análise proteômica foi estabelecida com o objetivo de analisar *spots* exclusivos dos complexos salivares da sanguessuga em questão comparados ao tecido muscular da ventosa do animal. Através desta análise comparativa entre tecidos, dentre outros importantes resultados, confirmou-se a presença das isoformas similares ao LAPP em 3 *spots* exclusivos à saliva, apresentando a mesma faixa de massa molecular e pl (Ricci-da-Silva et al., 2005).

			↓	
LAPPHofficinalis	01	MNSFLFSLA <u>C</u> SLLLVAIPAI	SAQDEDAG-GAGDETSEG-EDT	TGSDETPSTGGGGDGGNEE
L02F02_HDEP0545s	01FV.....V.....	----...A...G..N.....G.....	
H06A02_HDEP0318s	01FV.....V.....	G---D...NA..G..N.....T.....G.....	
H06A09_HDEP0059c	01Y.L.....LVA.V.R....	EE.GESEET.G..D.P.PP..	DGGEPPASPP.....
LAPPHofficinalis	59	TITAGNGD <u>C</u> WSKRPGWKL	PDNLLTKTEFTSVDE <u>C</u> RK <u>M</u>	<u>C</u> EESAVEPS <u>C</u> YILQINTETNE <u>C</u> Y
L02F02_HDEP0545s	57	A.....
H06A02_HDEP0318s	58	K.....A.....
H06A09_HDEP0059c	61	----SS.....R.DL.FDESI	KDSGT...E..K.K.L.---	NDR.AVI.V.DSNKK..
LAPPHofficinalis	119	RNNEGDVTWSSLQYDQPNV	VQWHLHA <u>C</u> SK----	147
L02F02_HDEP0545s	117	---- 145
H06A02_HDEP0318s	118	NRKNW 150
H06A09_HDEP0059c	113	IYP-A.AD.G.V.QGSTGYT	.Y.I...Q-----	139

Figura 9. Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzida dos clones completos similares em 94, 87 e 45% de similaridade ao inibidor de agregação plaquetária com o LAPP de *Haementeria officinalis*. Os aas idênticos estão representados por “.” e as diferenças digitadas. As cisteínas conservadas estão sublinhadas. A seta indica o local de clivagem para liberação do peptídeo sinal tanto no LAPP quanto nos clones conforme predição do programa SignalP.

Tabela 4 - Lista dos clones mais abundantes presentes no transcriptoma do complexo salivar de sanguessugas *H. depressa*. Em amarelo estão destacados os transcritos com potencial envolvimento no processo de alimentação do animal, que possuem o peptídeo sinal (SIG); circulado em vermelho estão destacado os transcritos similares ao LAPP da *H. officinalis*

Grupo #	Nº de clusters	Nº de ESTs	Identificação provável por similaridade usando BlastX - NR database ^a [<i>Organismo</i>]	Nº de acesso no banco de dados	e-value ^b	Similaridade por domínio (Rpsblast em CDD database ^c)	e-value ^b	SignalP ^d
1	19	28	carbonic anhydrase -related [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	ref NP_172285.1	7e-007	pfam00194, Eukaryotic-type carbonic anhydrase	6e-08	SIG
2	4	20	tropomyosin [<i>Mizuhopecten yessoensis</i>]	dbj BAB17858.1	6e-069	pfam00261, Tropomyosin	2e-39	NoSIG
3	12	17	myohemerythrin (MHR) [<i>Theromyzon tessulatum</i>]	sp Q9GYZ9	2e-034	pfam01814, Hemerythrin	2e-20	SIG ^f
4	2	17	cyclophilin Ovcyp-2 [<i>Onchocerca volvulus</i>]	gb AAC47233.1	7e-065	pfam00160, Pro_isomerase, Cyclophilin type	1e-59	NoSIG
5	8	9	LAPP - leech antiplatelet prot prec [<i>Haementeria officinalis</i>]	pir A42435	1e-023			SIG
6	5	8	tridegin [<i>Haementeria ghilianii</i>]		2e-034			SIG
7	3	8	alpha-1 tubulin [<i>Hirudo medicinalis</i>]	gb AAB07727.1	0.0	pfam03953, Tubulin_C	1e-49	NoSIG
8	1	7	hypothetical protein [<i>Streptomyces avermitilis</i>]	ref NP_823881.1	4e-021			SIG
9	1	7	troponin I (29.8 kD) [<i>Caenorhabditis elegans</i>]	ref NP_507250.1	4e-028	pfam00992, Troponin	3e-06	NoSIG
10	3	6	receptor of activated protein kinase C [<i>Biomphalaria glabrata</i>]	sp Q93134	6e-076			NoORF
11	1	6	60S ribosomal protein L7 [<i>Argopecten irradians</i>]	gb AAN05591.1	1e-068	pfam00327, Ribosomal protein L30p/L7e	2e-14	NoSIG
12	1	5	nucleoside-diphosphate kinase [<i>Bos taurus</i>]	sp P52174	1e-058	pfam00334, Nucleoside diphosphate kinase	1e-63	NoSIG
13	1	5	60S ribosomal protein L39 [<i>Branchiostoma belcheri</i>]	gb AAN52382.1	1e-020	pfam00832, Ribosomal_L39	3e-14	NoSIG
14	1	5	60S ribosomal protein L5 [<i>Gallus gallus</i>]	sp P22451	5e-095	pfam00861, Ribosomal L18p/L5e	6e-34	NoSIG
15	4	4	theromacin [<i>Theromyzon tessulatum</i>]	gb AAR12065.1	3e-017			SIG
16	3	4	therostasin precursor [<i>Theromyzon tessulatum</i>]	sp Q9NBW4	1e-030			SIG
17	1	4	40S ribosomal protein S4 [<i>Gallus gallus</i>]	sp P47836	e-121	pfam00900, Ribosomal_S4e	2e-14	NoSIG
18	1	4	cytosolic malate dehydrogenase A [<i>Danio rerio</i>]	gb AAO26199.1	e-113	pfam00056, lactate/malate dehydrogenase	1e-28	NoORF
19	1	4	hypothetical protein [<i>Anopheles gambiae</i>]	ref XP_306301.1	1e-013			NoORF
20	1	4	60S ribosomal protein L10 [<i>Lumbricus rubellus</i>]	gb CF839177.1	1e-086	pfam00687, Ribosomal protein L1p/L10e	6e-21	NoSIG

Fonte: Faria, 2004.

1.7 LAPP - Leech Antiplatelet protein precursor e transcritos similares ao LAPP em *H. depressa*

O LAPP é um inibidor de agregação plaquetária que age pela via do colágeno que foi encontrado no complexo salivar da sanguessuga *Haementeria officinalis*. Os primeiros estudos com o LAPP mostraram que esta proteína nativa tinha atividade inibitória sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno com o valor de IC50 em aproximadamente em 60 nM em plaqueta lavada e os testes realizados que o extrato glandular inibiu a agregação com todos agonistas utilizados, com exceção da trombina (Connolly et al., 1992; Keller et al., 1992).

Observaram que durante a ativação plaquetária o LAPP inibiu a liberação de ATP nas plaquetas de uma forma dose dependente, tendo maior eficácia em bloquear a secreção em PRP (Plasma rico em plaquetas) do que em plaqueta lavada (Connolly et al., 1992).

A molécula recombinante LAPP (rLAPP) foi expressa em leveduras e verificou-se que ela é capaz de inibir a adesão de plaquetas via colágeno do tipo I, III e IV com valores de IC50 na ordem de 70, 600, e 90 nM/L, respectivamente. O rLAPP mostrou-se um potente inibidor de adesão plaquetária tanto em condições estáticas como em fluxo, capaz de ligar-se ao colágeno inibindo a sua ligação ao FvW (Van Zanten et al., 1995).

Foi demonstrado também que o rLAPP previne não só a ligação do FvW ao colágeno como também a ligação do domínio $\alpha_2 I$ do receptor plaquetário $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno tipo I humano com IC50 de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, assim criou-se a hipótese de que a ligação do rLAPP ao colágeno ocorre de forma a inibir tanto sua ligação ao FvW quanto a este domínio, já que ambos epítomos possuem posições diferentes, porém próximas na molécula (Schaffer et al., 1993; Depraetere et al., 1999).

As divergências nas características estruturais primária dos transcritos presentes no cDNA dos complexos salivares de *H. depressa*, comparadas às do antiagregante de *H. officinalis* em diferentes níveis de similaridade, nos levam a sugerir que estes possam apresentar mecanismos de ação diferentes no sistema hemostático, provavelmente ainda na agregação plaquetária, o que poderá ser analisado através de estudos de atividade (Faria et al., 2005).

Dentre as isoformas encontradas nos complexos salivares da sanguessuga em questão, aquela com menor similaridade ao LAPP (45%), denominada de

H06A09, ainda apresenta todas as cisteínas conservadas (Figura 9) e estrutura tridimensional predita semelhante ao rLAPP, apresentando forma característica com 5 folhas β e 1 α hélice (Figura 10). Tal molécula torna-se um alvo promissor para estudos de caracterização com importância médico-científica.

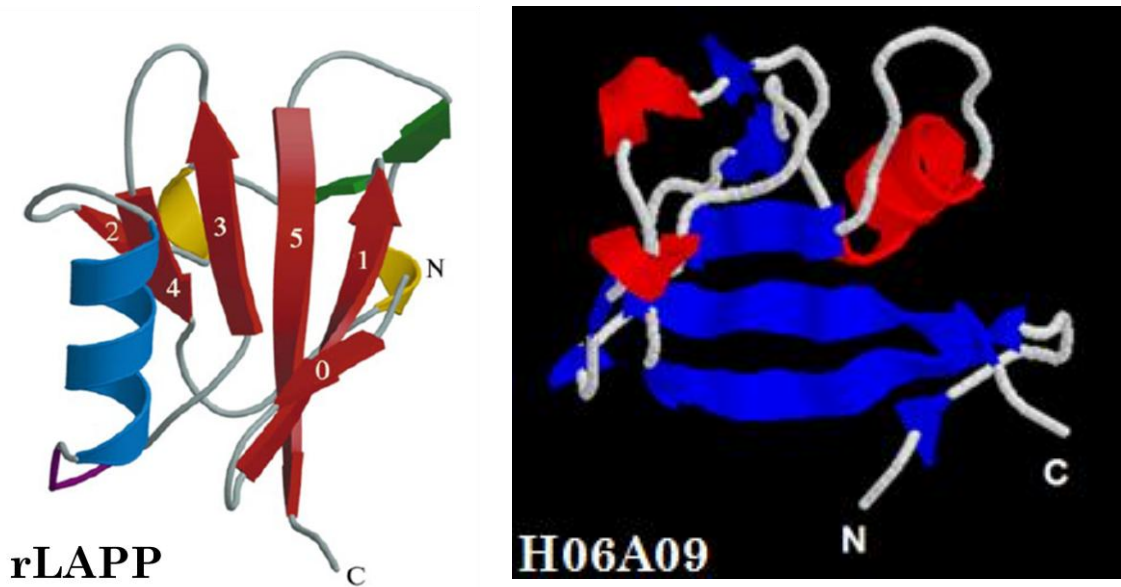


Figura 10. Estruturas terciárias. (A) Estrutura terciária do rLAPP (inibidor de agregação plaquetária proveniente da sanguessuga *H. officinalis*); (B) Predição da estrutura terciária da proteína proveniente do clone H06A09, da sanguessuga *H. depressa*. Fonte: Faria, 2004.

1.8 Expressão em sistema Procarioto

A história da biotecnologia moderna se iniciou com o desenvolvimento da Penicilina na primeira metade do século XX. A partir de então os processos biotecnológicos são utilizados na produção de vitaminas, hormônios, antibióticos, vacinas, enzimas e medicamentos (Vaz, 2007). O primeiro anticoagulante e umas das primeiras drogas assim obtidas ainda em uso difundido é a Heparina, esta foi descoberta em 1916 por Jay McLean, estudante no segundo ano de medicina, e William Henry Howell, um fisiologista (Wardrop e Keeling, 2008).

Grande parte das proteínas utilizadas para finalidade terapêutica apresentam estruturas complexas, em geral associadas a modificações pós traducionais. Quando a obtenção de proteínas por meios diferentes da extração direta da fonte biológica, essas proteínas (ou outra moléculas bioativas) são conhecidas como biofármacos (Walsh, 2002).

A *Escherichia coli*, uma bactéria gram negativa, é utilizada para a produção de proteínas recombinantes, sendo de fácil manipulação, rápida e barata. Essas vantagens e as riquezas do conhecimento bioquímico e genético desse organismo possibilitam a produção econômica de proteínas sensíveis, como a insulina e fator de crescimento bovino (Swartz, 2001).

Dentre os diversos sistemas de expressão, esse sistema procarioto continua sendo vantajoso, devido ao seu crescimento rápido, os conhecimentos do microorganismo, disponibilidade de inúmeros vetores disponíveis e cepas mutantes, como indicado na tabela 5 (Baneyx, 1999).

Este sistema apresenta algumas desvantagens como os processos pós-traducionais, podendo a proteína heteróloga não ter a conformação tridimensional correta e ausência de glicosilação e formação de corpúsculos de inclusão, quando ocorre alto nível de expressão citoplasmática e devido à pequena quantidade de chaperonas no citoplasma (Schmidt, 2004).

A formação de corpúsculos de inclusão pode ter vantagens, devido à facilidade de purificação, alto grau de pureza e concentração da proteína e proteção contra proteases, porém muitas vezes pode ocorrer perda da sua atividade biológica, prejuízo na integridade protéica e baixo rendimento e maior custo devido à renaturação (Tan et al., 2002; Baneyx, 1999).

Tabela 5 - Linhagens de *Escherichia coli* utilizadas para expressão de proteínas recombinantes

Linhagem	Derivação	Principais características
AD494	K-12	Mutante em <i>trxB</i> facilita a formação de pontes de dissulfeto no citoplasma.
BL21	B834	Deficiente nas proteases lon e ompT.
BL21 <i>trxB</i>	BL21	Mutante em <i>trxB</i> facilita a formação de pontes de dissulfeto no citoplasma; Deficiente nas proteases lon e ompT
BL21 CodonPlus-RIL	BL21	Aumenta a expressão de proteínas eucarióticas que contém códons raramente utilizados em <i>E. coli</i> : AGG, AGA, AUA, CUA; Deficiente nas proteases lon e ompT.
BL21 CodonPlus-RP	BL21	Aumenta a expressão de proteínas eucarióticas que contém códons raramente utilizados em <i>E. coli</i> : AGG, AGA, CCC; Deficiente nas proteases lon e ompT.
BLR	BL21	Mutante em raça estabiliza repetições em série; Deficiente nas proteases lon e ompT
B834	B	Auxotrófica para Met, marcação de metioninas por S ³⁵ .
C41	BL21	Mutante concebido para a expressão de proteínas de membrana.
C43	BL21	Duplo mutante concebido para a expressão de proteínas de membrana
HMS174	K-12	Mutante em <i>recA</i> ; Resistência a rifampina.
JM 83	K-12	Utilizável para o direcionamento de proteínas para o periplasma.
Origami	K-12	Mutante em <i>trxB</i> e <i>gor</i> facilita significativamente a formação de pontes de dissulfeto no citoplasma.
Origami B	BL21	Mutante em <i>trxB</i> e <i>gor</i> facilita significativamente a formação de pontes de dissulfeto no citoplasma; Deficiente nas proteases lon e ompT
Rosetta	BL21	Aumenta a expressão de proteínas eucarióticas que contém códons raramente utilizados em <i>E. coli</i> : AUA, AGG, AGA, CGG, CUA, CCC e GGA; Deficiente nas proteases lon e ompT.
Rosetta-Gami	BL21	Aumenta a expressão de proteínas eucarióticas que contém códons raramente utilizados em <i>E. coli</i> : AUA, AGG, AGA, CGG, CUA, CCC e GGA; Deficiente nas proteases lon e ompT; Mutante em <i>trxB</i> e <i>gor</i> facilita significativamente a formação de pontes de dissulfeto no citoplasma.
Rosetta-Gami B	BL21	Combina características-chave das linhagens BL21, Origami e Rosetta.

Fonte: Adaptado de Terpe, 2006.

O vetor pAE (Figura 11) tem sido uma alternativa bastante utilizada na produção de diversas proteínas recombinantes como Lopap (Reis et al., 2006), Losac (Alvarez-Flores et al., 2011), Amblyomin (Batista et al., 2008) e Insularina (Neves et al., 2004). A clonagem neste vetor acarreta na expressão de uma proteína com 6 resíduos de histidinas na porção N-terminal. Esse vetor oferece resistência a Ampicilina e tem funcionamento similar ao sistema operon lac, onde um inibidor (IPTG, molécula similar a lactose) se liga ao repressor, liberando a transcrição do gene de interesse (Ramos et al., 2001).

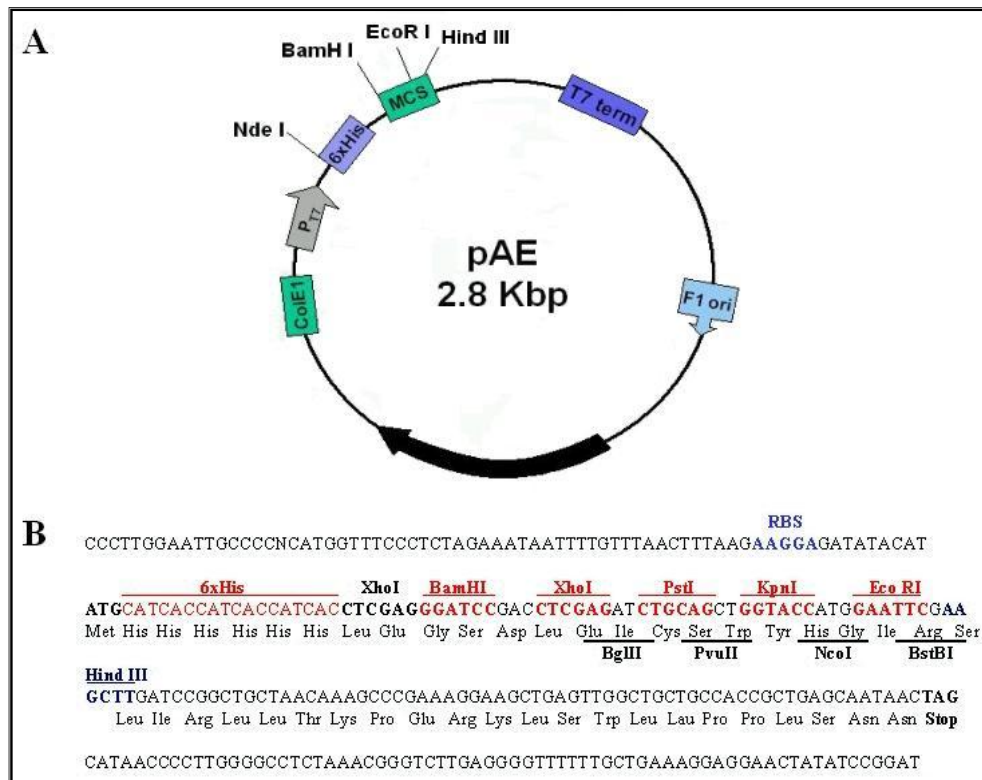


Figura 11. Mapa do vetor de expressão pAE

Fonte: Ramos et al., 2001 e Junqueira-De-Azevedo et al., 2001.

1.9 Expressão em Sistema Heterólogo

Os fungos são utilizados pelo homem desde longa data, dentre eles as leveduras (fungos unicelulares) que tem grande conotação na indústria, sendo utilizadas desde processos fermentativos, como a panificação e produção de etanol (Kingsman e Kingsman, 1998)

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, já bem caracterizada e amplamente utilizada em diversos processos biotecnológicos, também tem sido utilizada em sistemas de expressão de proteínas recombinante, possuindo vantagens tanto do sistema procaríoto (fácil manipulação, crescimento rápido, genética molecular bem caracterizada) quanto o sistema eucarioto (realização de processamentos e modificações pós-traducionais) (Romanos et al., 1992; Cereginho e Gregg, 1999).

Entretanto, uma limitação encontrada neste sistema é a hiperglicosilação de determinadas proteínas a serem secretadas durante a expressão, podendo ser um grande problema em casos de proteínas com finalidade terapêutica a serem injetáveis, pois podem causar reações imunogênicas em seres humanos (Gurkan e Ellar, 2005). Uma alternativa para contornar este problema vem sendo o uso da levedura metilotrófica *Pichia pastoris*.

A *Pichia* possui vantagens em comparação ao *Saccharomyces* como, por exemplo, a sua preferência por um crescimento respiratório, sendo um fraco fermentador. Em culturas de alta densidade celular o etanol, produto dos fermentadores, pode chegar a altos níveis sendo tóxico para a célula, limitando seu crescimento e produção da proteína heteróloga (Cregg e Cereguino, 2001).

Dentre os grupos de leveduras que são capazes de metabolizar o metanol, apenas algumas são capacitadas de utilizar o metanol como única fonte de carbono, (metilotrófica). Esta característica foi amplamente explorada nas décadas de 60-70 e dentre as leveduras metilotróficas estava a *Pichia pastoris*, que hiperexpressa a enzima álcool oxidase (Cregg et al., 2000).

A enzima álcool oxidase (AOX) é a primeira enzima a agir na chamada “via metabólica do metanol” (Figura 12), sendo responsável pela oxidação do metanol (CH₃OH) gerando formaldeído (HCOH) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A produção desta enzima, em *Pichia pastoris*, é efetuada pelos genes *AOX1* e *AOX2*, onde a transcrição do primeiro gene é fortemente induzida pelo metanol enquanto o segundo é fracamente expresso (Cereghino e Cregg, 2000).

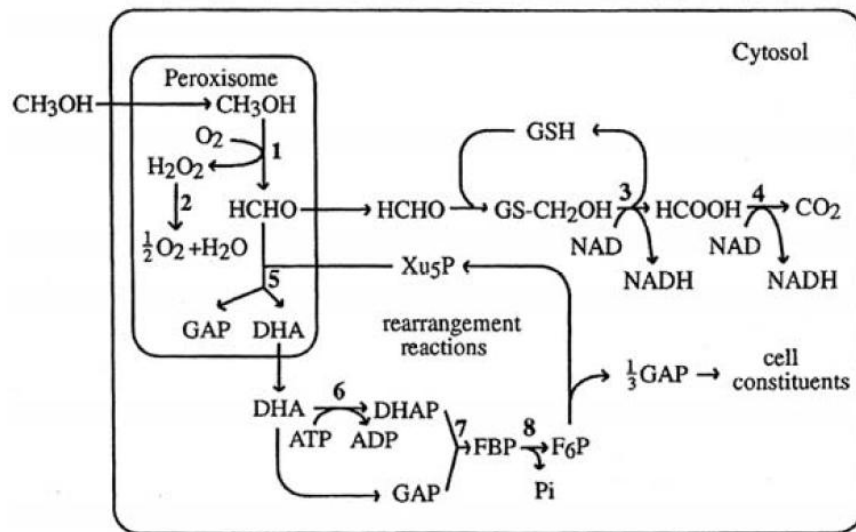


Figura 12. Via metabólica do metanol em *Pichia pastoris*. (1) reação da enzima álcool oxidase representada na reação de oxidação do metanol
 Fonte: Cereghino e Cregg, 2000.

A *Pichia pastoris* é uma das quatro linhagens de leveduras que podem metabolizar o metanol, e a produção de proteína recombinante utilizando esse organismo tem algumas vantagens, como o fato dessa levedura secretar poucas proteínas nativas levando a uma purificação da proteína heteróloga mais facilitada quando utilizando um vetor para secreção (Cregg et al., 1993).

Esse organismo possui uma via eucariótica de secreção promovendo modificações pós- traducionais, como formação de pontes dissulfeto, O-, N-, processamento de seqüência sinal e glicosilação (Hohemblum et al., 2004). A glicosilação feita por essa linhagem se aproxima muito aos mamíferos com adição de aproximadamente 8 a 14 resíduos de manose em cadeias de oligossacarídeos (Grinna e Tschoop, 1989), diferente de *S. cerevisiae* que pode hiperglicosilar proteínas adicionando até 40 resíduos de manose (Innis, 1989). Além de ter a vantagem de poder converter de 30 a 40% do seu peso em proteína, sendo assim classificada no status GRAS (Ratner, 1989).

A proteína heteróloga produzida neste sistema pode permanecer intracelular ou ser secretada, quando secretada se torna mais vantajosa devido à característica da *Pichia* secretar poucas proteínas nativas. O mais utilizado são vetores de expressão que traduz proteínas com um peptídeo sinal que direciona a proteína para essa via. Esse é o fator α , um peptídeo de 85 aminoácidos proveniente da *S.*

cerevisiae, onde este é clivado por uma peptidase-sinal na membrana de retículo (Daly e Hearn, 2005).

Para inserção do transcrito no genoma fúngico alguns vetores plasmidiais podem ser utilizados. Tais vetores são linearizados e podem através do processo de transformação ser incorporados ao genoma da levedura.

O vetor de clonagem e expressão pPIC9K é um vetor bifuncional (“*shuttle vector*”) de *E. coli* e *P. pastoris* (Figura 13) contém marcadores de seleção apropriados para cada um dos hospedeiros: 25 partes corresponde às seqüências necessárias para seu emprego em *E. coli* (do plasmídeo pBR322), gene para resistência a ampicilina (AmpR), origem de replicação (ColE1) e sítios de clonagem; e, parte corresponde ao gene *HIS4* de *P. pastoris*, que codifica a enzima histidinol desidrogenase (marcador para seleção de transformantes His⁺, possibilitando a complementação gênica da cepa GS115 (que é his4). O vetor, ainda, carrega a seqüência sinal nativa do gene MF alfa de *S. cerevisiae*, para a secreção da proteína heteróloga (HIGGINS e CREGG, 1998). O vetor pPIC9K possui, ainda, o gene bacteriano que confere resistência à kanamicina (KanR) e que em *P. pastoris* confere resistência ao antibiótico G418R (gentamicina) (Invitrogen, 2008).

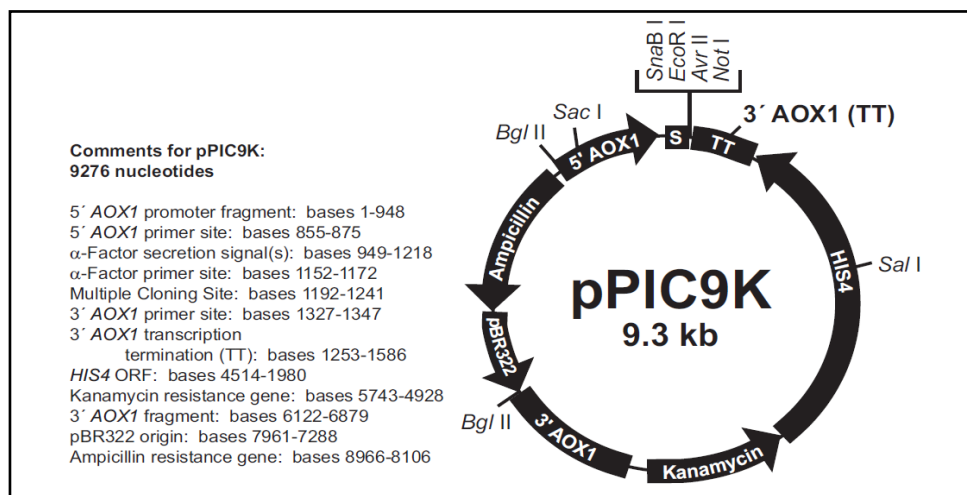


Figura 13. Mapa do vetor de expressão pPIC9K

Fonte: Invitrogen, 2008.

O sistema de expressão em *Pichia pastoris*, por oferecer economia, ser de fácil manipulação e produzir altos níveis de expressão com maior proximidade estrutural por suas vantagens de modificações pós traducionais, é também uma

ótima opção para a produção de possíveis moléculas recombinantes com foco para futura produção de fármacos.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi clonar e expressar o transcrito H06A09 proveniente da biblioteca de cDNA dos complexos salivares de sanguessugas *H. depressa* e obter a molécula recombinante em sua forma ativa. Isolar a molécula e caracterizá-la estrutural e funcionalmente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Estão demonstrados a seguir todos os esforços reunidos para obtenção da molécula recombinante. Para tanto, a figura 14 resume os passos utilizados para cada estratégia mencionada, e subseqüentemente os Materiais e Métodos estarão descritos.

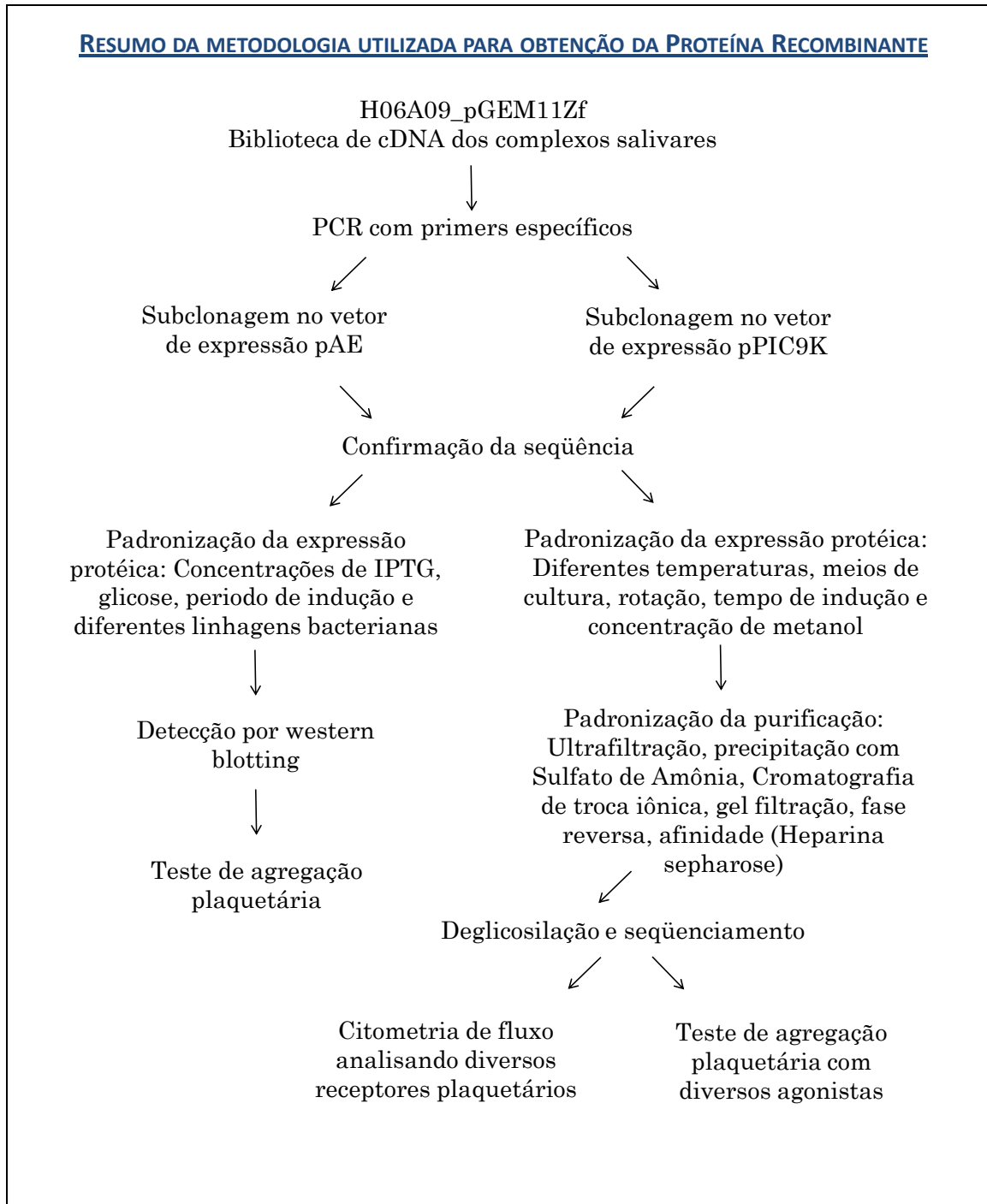


Figura 14. Resumo das Estratégias para obtenção das moléculas recombinantes, exemplificado para o clone H06A09.

3.1 Obtenção do Transcrito de Interesse

3.1.1 Clone eleito para expressão

O clone eleito para estudo vem sendo mantido acondicionado em placas de 96 poços mantenedoras da biblioteca de cDNA dos complexos salivares da sanguessuga *Haementeria depressa*, utilizada previamente para obtenção do perfil de ESTs (Faria et al., 2005), o acondicionamento é feito em freezer a -80°C (Thermo Forma -86C Ult Freezer).

Os transcritos da biblioteca de cDNA estão inseridos em vetor pGEM11Zf, a partir do qual foi dado início aos procedimentos realizados a seguir. O mapa do vetor pGEM11Zf e os pontos de clivagem de enzimas de restrição se encontram na figura 15.

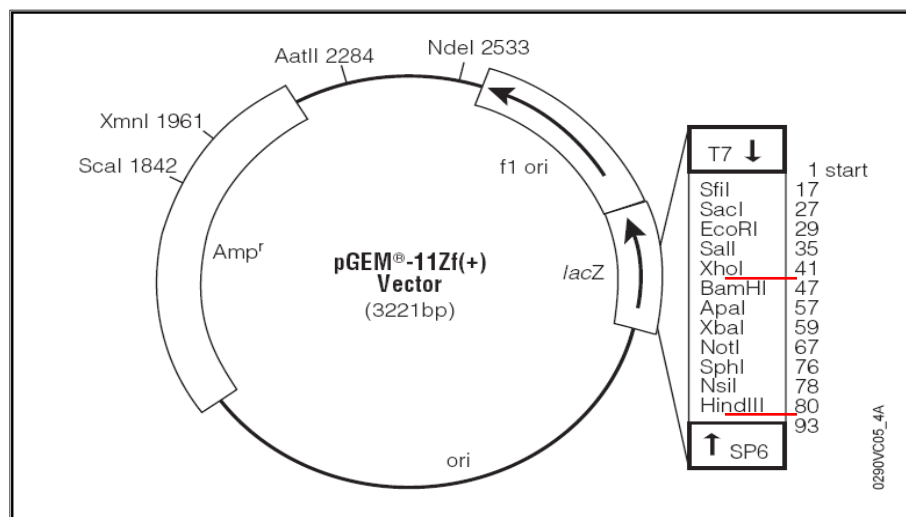


Figura 15. Mapa do vetor pGEM[®]-11Zf (Promega).

O transcrito H06A09_pGEM11Zf, com 572 pares de bases, eleito para realização deste trabalho, assim como os demais clones similares ao inibidor de agregação plaquetária havia sido previamente seqüenciado, o que facilitou a análise de restrição de enzimas e o desenho dos oligonucleotídeos específicos para a clonagem descrita neste trabalho.

3.1.2 Análise do mapa de restrição do clone

Para traçar a estratégia de clonagem do transcrito de interesse foi realizada uma análise do mapa de restrição da seqüência do cDNA de interesse através do software *Webcutter 2.0*, copyright 1997 Max Heiman (Max, 2008).

3.1.3 Inóculo do clone eleito

O clone foi inoculado em 7 mL de meio de cultura 2xYT (Tabela 6) contendo ampicilina (100 µg/mL), em frasco de 50 mL aerado, sob agitação a 250 rpm a 37 °C por cerca de 18 horas em agitador orbital (Thermo – Electrom Corporation; modelo 480).

Tabela 6 - Reagentes para o preparo dos meios de cultura para bactérias

Reagentes	Meio 2xYT	Meio 2xYT Ágar	Meio LB	Meio LB Ágar
Triptona	16g	16g	10g	10g
Extrato de Levedura	10g	10g	5g	5g
NaCl	5g	5g	10g	10g
Ágar	-	15g	-	15g
H ₂ O milli-Q qsp	1L	1L	1L	1L

3.1.4 Miniprep - Extração do DNA plasmidial bacteriano

Para extração do DNA plasmidial, após o inóculo, estes foram submetidos ao protocolo de miniprep - extração do DNA plasmidial (neste caso, contendo o inserto de interesse) da bactéria. Tal procedimento foi realizado utilizando o Kit de miniprep utilizando coluna de sílica *Concert Rapid Plasmid* – Promega (Promega S.A., Madison,Wi, EUA), conforme instruções do manual do fabricante.

O DNA foi eluído da coluna, pela adição de 100 µL de água estéril seguido de centrifugação por mais 1 minuto nas mesmas condições. Uma alíquota de 4µl deste material foi analisada em gel de agarose 1% corada com brometo de Etídio e o restante estocado a -20 °C.

3.1.5 Eletroforese em Gel de Agarose

A eletroforese em gel de agarose é realizada para visualização da molécula de DNA de interesse, onde utilizamos géis com concentrações que variaram de 0,8 a 1%, de acordo com o tamanho do DNA submetido a eletroforese, em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 10 mM; pH 8.0) contendo Brometo de Etídio (10 mg/mL). As amostras foram preparadas através da adição de azul de bromofenol 0,25% (p/v), Xileno cianol 0,25% (p/v) e glicerol 30% (p/v). O gel foi submetido a 160 mA de corrente e 100 Volts por aproximadamente 40 minutos, após migração era analisado em transluminador de luz UV (Fotodyne – UV21), onde o DNA corado pelo Brometo de Etídio era visualizado de forma luminescente alaranjada.

3.1.6 Eluição de DNA do Gel de Agarose

Para eluição da molécula de DNA foi utilizado o kit “*Concert Gel Extraction Systems*” -Life Technologies (Promega). O processo de eluição da correspondente ao DNA de interesse foi realizado conforme descrito no manual do fabricante.

Como etapa final do procedimento o DNA foi eluído da coluna pela adição de 50 μ L da água livre de nuclease, sendo incubado a temperatura ambiente e centrifugado por 1 minuto a 14.000 rpm e estocado a -20 °C.

3.1.7 Quantificação de DNA

Para estimar a concentração de DNA da amostra, esta era diluída em H₂O milli-Q, homogeneizada, transferida para cubeta de quartzo e submetida para leitura de densidade óptica em comprimentos de onda de 260 nm (DO₂₆₀) e 280 nm (DO₂₈₀), assim poderíamos além de quantificar também estimar a contaminação com proteínas e calcular o grau de pureza da amostra avaliando o resultado da fração DO₂₆₀/DO₂₈₀ (quanto mais próximo de 2,0 a amostra está mais livre de proteínas). As leituras de densidade óptica foram realizadas em espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech).

Consideramos para cada unidade de DO_{260} uma estimativa de concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ de DNA. Assim, a seguinte equação para se estimar a concentração de DNA da amostra foi utilizada: **[DNA] $\text{mg/mL} = DO_{260} \times 50 \times \text{fator de diluição}$**

3.1.8 Seqüenciamento de DNA

Os seqüenciamentos obtidos durante o projeto foram realizados no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, utilizando o método da terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (dNTPs) (Sanger et al., 1977), utilizando-se dNTPs marcados com diferentes fluoróforos. Os dNTPs, ddNTPs marcados e a Taq Polimerase utilizados são reagentes do kit *Ready Reaction kit* (Applied Biosystems) e a reação foi preparada da seguinte forma:

A cada 200ng de DNA foram acrescentados de 2 μL de Big Dye (Applied Biosystems), 1 μL de primer (específico para cada seqüenciamento) (1,6pmol final por reação), 6 μL de Tampão *Save Money* (Tris 200 mM pH 9, 0 e 5 mM de MgCl_2) e água livre de DNases qsp 20 μL . Esta reação foi submetida à termociclagem padrão [95 °C por 4 min; 96 °C por 30 s + 50 °C por 15 s + 60 °C por 4 minutos (40 ciclos); 4 °C $^\infty$].

Após a reação, foi feita uma precipitação alcoólica do produto da termociclagem que foi então ressuspendido em 20 μL de tampão de aplicação do gel de seqüenciamento (formamida HiDi) (Applied Biosystems), seguidos de uma reação de desnaturação a 96 °C por 4 minutos e incubação imediata no gelo. O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador *ABI 3100 da Applied Biosystem*, seguindo instruções detalhadas do fabricante.

3.1.9 Preparo de Bactérias Cálcio-Competentes

As células competentes foram produzidas de acordo com Lenderberg e Cohen (1974) e Morrison (1977). Para o preparo de bactéria competente DH5 α , BL21DE3, Rosetta-Gami e Origami, uma colônia foi repicada em 3 mL de meio líquido 2xYT e incubou-se *overnight* sob agitação (250rpm) a 37 °C. Foram adicionados 100 μ L da cultura em 50 mL de meio 2xYT e incubou-se sob agitação a 37 °C por tempo necessário até atingir uma $DO_{550nm} = 0,5 - 0,6$ (período de crescimento exponencial) entre 2 e 3 horas. O frasco foi transferido imediatamente para o gelo.

Foram adicionados 0,5 mL de $MgCl_2$ 1M e em seguida transferido para um tubo de polipropileno de 50 mL (previamente gelado). Permanecendo em repouso no gelo por 15 minutos e em seguida submetido à centrifugação a 3.000 rpm, 12 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as bactérias (localizadas no *pellet*) foram ressuspensas gentilmente em 10 mL de solução RF-I (Tabela 07), deixadas em repouso por 15 minutos no gelo, e novamente submetidos à centrifugação a 3.000 rpm por 12 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 2 mL de solução RF-II (Tabela 07), alíquotas de 100 μ L foram congeladas imediatamente a -80 °C.

Tabela 7 - Reagentes para o preparo das soluções RF-I e RF-II

RF-I: pH 5,8 (acertar com ácido acético, estéril por filtração)	
KCl 1M	10 mL
$MnCl_2$ 1M	5 mL
Acetato de Potássio 0,5 M pH6,9	6 mL
$CaCl_2$ 1M	1 mL
Glicerol 87%	17,24 mL
Água qsp	100 mL
RF-II: pH 6,8 (acertar com NaOH, estéril por filtração)	
KCl 1M	200 μ L
Na-MOPs 0,5M pH7,0	200 μ L
$CaCl_2$ 1M	1,5 mL
Glicerol 87%	3,44 mL
Água qsp	20 mL

3.1.10 Transformação da bactéria com o plasmídeo

Para transformação bacteriana com o plasmídeo utilizamos o protocolo para bactérias cálcio-competentes por choque térmico, de acordo com Sambrook et al.,1989. Para tanto, utilizou-se estoques de bactérias competentes previamente preparadas.

Para este procedimento iniciou-se com a retirada de 100 µL da bactéria competente do freezer -80 e incubação por 15 minutos em gelo; após este período adicionou-se cerca de 75 ng do DNA de interesse e incubou-se em gelo por 30 minutos. A bactéria foi então submetida a choque térmico através da incubação por 2 minutos a 42 °C, seguida de retorno ao gelo por mais 3 a 5 minutos. Após este procedimento, 300 µL de meio de cultura 2xYT foram adicionados às bactérias que permaneceram sob agitação a 250 rpm, a 37 °C, por 1 hora.

Após o crescimento, diferentes volumes (70uL, 150uL) do inóculo foram plaqueados em meio 2xYT-Agar contendo ampicilina (100 mg/mL) e incubados por cerca de 20 horas a 37 °C. As colônias crescidas após este período continham o plasmídeo de interesse.

3.2 Clonagem em Sistema Procarioto

Para determinar as enzimas a serem utilizadas na clonagem dos insertos com a análise dos sítios de restrição, considerou-se o mapa do vetor de expressão pAE, eleito por sua propriedade de acrescentar 6 resíduos de histidinas à porção N-terminal da proteína de interesse, fator que auxiliaria na purificação da mesma.

3.2.1 Desenho de primers

Com a seqüência do clone H06A09_pGEM11Zf obtida previamente da biblioteca de cDNA (Faria, 2005) depositada no GeneBank, desenhamos oligonucleotídeos específicos para região 5' do transcrito a inserir sítios específicos para posterior clonagem em vetor de expressão, conforme exemplificado na tabela 08, e dois *primers* universais denominados SP6 e T7 que são complementares a regiões dos vetores utilizados.

Tabela 8 - Primers utilizados para clonagem em *E. coli*

Nome	Seqüência
NT-H06A09	5' <u>GGA TCC</u> CAG GAT GAG GAA GAG 3' <i>Bam</i> HI
SP6	5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG 3'
T7 Reverse	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'

3.2.2 PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

O clone, após plaqueamento em 2xYT-Ágar contendo ampicilina, foi novamente inoculado e submetido a protocolo de miniprep e o material proveniente da miniprep foi utilizado como DNA molde para uma reação de PCR utilizando como oligonucleotídeos o *primer* direto e o *primer* reverso SP6 realizadas de acordo com Saiki et al. (1985) e Mezei e Storts (1994) (Tabela 08).

Para reação de PCR com volume total de 50 µL foram utilizados de 0,5 µL (~15 ng) de DNA molde, 5 µL de tampão 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8.4, KCl 500 mM), 2 µL MgCl₂ 50 mM, 1 µL de dNTP (10 mM), 1 µL do primer SP6 (20 pmol) (BioNEER, São Paulo, SP, Brasil), 1 µL do primer NT-H06A09 (20 pmol) (BioNEER) e 2 Unidades de Taq DNA Polimerase platinum - Invitrogen. As condições de ciclagem incluíram uma desnaturação por 5 minutos a 94 °C, seguindo de 40 ciclos de 45 segundos para a temperatura de abertura das fitas (94 °C), 45 segundos para o anelamento dos primers e dois minutos para ação intensa da enzima Polimerase (72 °C); após os ciclos, incubou-se por 5 minutos a 72 °C seguidos de manutenção a 4 °C (Master cycler personal - Eppendorf) até momento de uso ou -20 °C para estocagem. O esquema geral da reação pode ser visualizado na figura 16.

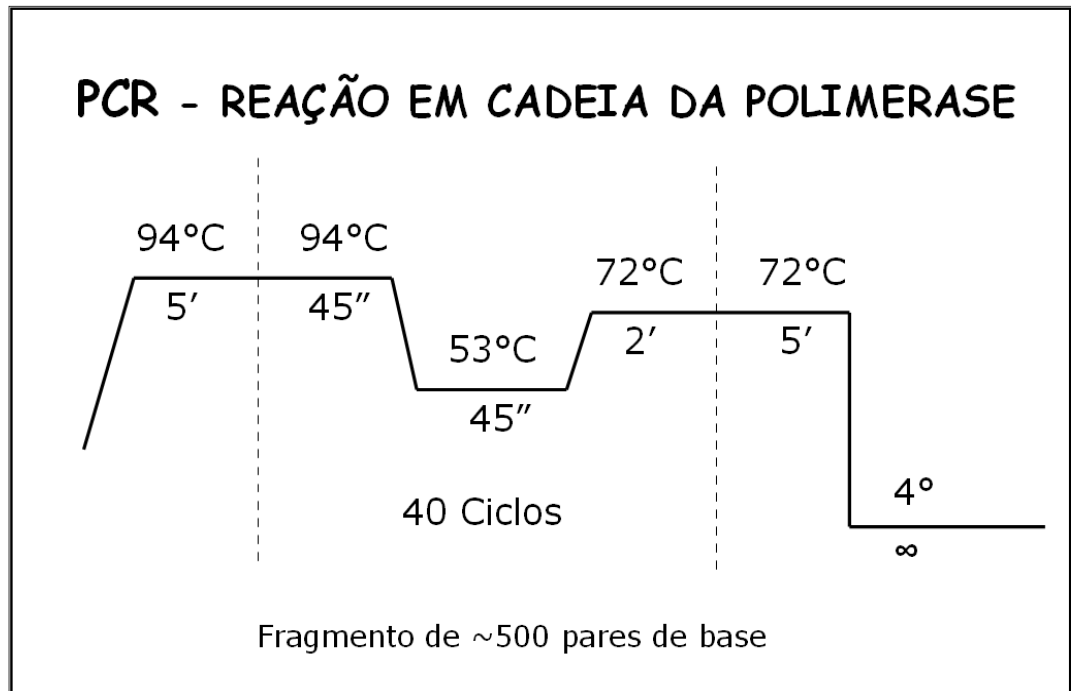


Figura 16. Condições de ciclagem para amplificação do clone H06A09.

Todo o produto da reação de PCR (50 μ L) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corada com brometo de Etídio e após visualização a banda de interesse foi recortada do gel com auxílio de uma lâmina de bisturi estéril e purificada em microcoluna de sílica.

3.2.3 Digestão Enzimática do Inseto H06A09 e vetor pAE

Tanto o inserto proveniente da eluição do gel do produto de PCR quanto o vetor pAE vazio foram digeridos com as enzimas *Hind* III e *Bam*H I - Life Technologies (Promega®) utilizando para tanto o seguinte protocolo.

O inserto e o vetor pAE (30 μ L) foram eluído do gel e incubados separadamente com 4 μ L do Tampão, 3 μ L de água livre de nuclease e 3 μ L de uma das enzimas (3 unidades) por 3 horas a 37 °C. Após este período retirou-se uma alíquota de 3 μ L desta primeira digestão e deu-se início a segunda digestão adicionado-se 3 μ L da segunda enzima (3 unidades) aos 37 μ L provenientes da primeira digestão, incubou-se por mais 2 horas a 37 °C em termo-bloco - Digital Heatblock (VWR Scientific, ATI Orion, EUA). Uma alíquota do inserto e o vetor não digeridos, uma alíquota referente à primeira digestão e o material digerido com as

duas enzimas foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de Etídio. As bandas correspondentes ao pAE e ao inserto digerido com as duas enzimas foram recortadas do gel e eluídas. A quantificação do DNA foi realizada.

3.2.4 Ligação do inserto ao vetor pAE

Com o vetor pAE e o inserto referente à seqüência de interesse digerida com as mesmas enzimas de restrição formaram-se dois sítios de ligação em comum entre eles possibilitando sua ligação na direção correta de interesse. A ligação do inserto ao vetor foi realizada da seguinte forma: incubou-se a mesma concentração em molaridade do vetor e do inserto (2,63 mM) com 5 µL da enzima T4 DNA Ligase (2,5 unidades) em 2 µL de tampão 10x contendo ATP (Tris-HCl 300 mM pH 7.8, MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM, ATP 10 mM) e água livre de DNase qsp 20 µL por 18 horas entre 4 – 8 °C.

O produto da ligação foi utilizado para transformação de bactérias DH5α cálcio-competentes por choque-térmico e plaqueado em meio 2xYT/Agar/ampicilina, para selecionar as colônias positivas. A partir do inóculo feito das colônias crescidas em 2xYT/ampicilina, foi realizada a miniprep.

3.2.5 Confirmação da seqüência e transformação

O material proveniente da clonagem em pAE (H06A09_pAE) teve sua seqüência confirmada por seqüenciamento de DNA. E após a confirmação da seqüência, o H06A09_pAE, foi utilizado para transformação de bactérias *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) cálcio-competentes. Esta linhagem é recomendada para expressão de proteínas, devido à ausência da protease *lon*, que foi perdida naturalmente e codificada para ser deficiente para a protease *Omp T*.

3.3 Expressão da Proteína Recombinante – Sistema Procarioto

O cultivo do clone H06A09_pAE em cepa bacteriana *E. coli* BL21(DE3) competente iniciou-se através de um pré-inóculo cultivado em 5 mL de meio 2xYT contendo ampicilina (100 µg/mL) em tubo cônico 50 mL, sob temperatura de 37 °C e agitação de 250 rpm.

Após aproximadamente 17 horas de cultivo, o pré-inóculo foi diluído em 100 mL de meio 2xYT–Amp em erlenmeyer de 1L e seu crescimento foi acompanhado por leitura em espectrofotômetro até chegar a uma DO₆₀₀ entre 0,5 e 0,6.

Quando a cultura bacteriana atingiu a DO₆₀₀ esperada colheu-se uma amostra de 1 mL (T0) para verificação da expressão protéica basal e então foi feita a indução da transcrição do DNA plasmidial pela adição de IPTG (concentrações variadas entre 0,1 mM e 10 mM), foram testadas também induções contendo ou não glicose na concentração de 20 mM final.

A indução por IPTG (com ou sem glicose) perdurou por três horas quando uma nova amostra de 1 mL foi retirada (T3). O restante da cultura foi centrifugado (3200 g, 15 minutos, temperatura ambiente). Uma amostra do sobrenadante foi retirada (S0). As células isoladas foram lavadas com solução salina (NaCl 150 mM), e a centrifugação foi realizada novamente nas mesmas condições. As células obtidas (*pellet*) foram mantidas a -20 °C até serem submetidas ao processo de lise no dia seguinte.

Para o processo da lise, as células encontradas no *pellet* foram ressuspensas em 2 mL tampão de lise (Na₂HPO₄ 50 mM; NaCl 300 mM; Imidazol 10mM Triton X100 1% v/v), dispersas com auxílio de um sonicador (Branson Sonifier 450) utilizando os seguintes parâmetros do aparelho: amplitude: 7; tempo: 1 minuto; pulso: contínuo e rompidas por 6 ciclos adicionais nas mesmas condições. A fração solúvel (S1) e insolúvel, decorrente do processo da lise, foram obtidas por centrifugação (20.198g, 15 minutos a 4°C), sendo o S1 o sobrenadante desta etapa.

O precipitado foi lavado com 1,5 mL de água destilada, reunido em um único tubo e novamente centrifugado (20.198 x g, 15 minutos a 4 °C). O precipitado (corpúsculos de inclusão) foi lavado e ressuspenso em 5 mL de tampão de solubilização (Tris 100 mM; NaCl 0,5 M; Uréia 8 M; β-mercaptoetanol 10 mM) e incubado a temperatura ambiente (18-23 graus) durante 16-20 horas sob leve agitação. Após este período, o material insolúvel visível foi removido por

centrifugação (3.220g, 15 minutos a 4 °C). O material solubilizado desta etapa foi denominado S2, o insolúvel foi acrescido de 3 mL de tampão de solubilização e novamente mantido nas mesmas condições, o novo material solubilizado foi denominado então S3.

Todas as etapas do processo de expressão T0, T3, S0, S1, S2 e S3 foram armazenados a -20°C. Uma amostra de cada fração (20µl) foi submetida em SDS-PAGE.

3.3.1 SDS-PAGE

O protocolo de SDS-PAGE utilizado no projeto foi seguido de acordo com o método descrito por Laemmli (1970) com alterações, utilizando o sistema Mini-VE (Hoefer SE 600 – Pharmacia). Os géis de corrida foram preparados nas concentrações de 12,5 e 15%. O gel de empilhamento foi preparado na concentração de 5%

Para aplicação das amostras utilizou-se Tampão de Aplicação com redução (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; SDS 0,14M; Glicerol 20% v/v; β-Mercaptoetanol 2% v/v; Azul de Bromofenol 0,03 mM) na proporção de 1:1 com as amostras. A corrida eletroforética foi realizada através de corrente fixa em 17 mA para cada gel de 5 mL de volume, a temperatura ambiente durante um período aproximado de 2 horas. Como padrão de massa molecular no gel utilizou-se o Kit de calibração LMW para SDS-PAGE (Amersham Biosciences), que apresenta as seguintes proteínas com massas moleculares pré-definidas: fosforilase b – 97 kDa; albumina – 66 kDa; ovalbumina – 45 kDa; anidrase carbônica – 30 kDa, SBTI - 20,1kDa e α-lactalbumina -14,4 kDa.

Após a migração eletroforética, o gel foi corado por Coomassie Brilliant Blue R 250 (Weber e Osborn, 1969) ou por AgNO₃ (Morrisey, 1981).

3.3.2 Western Blotting

Após a separação em SDS-PAGE, foi realizado a eletrotransferência das proteínas do gel para uma membrana de PVDF segundo TOWBIN et al. (1979). Esta se dá deixando em íntimo contato o gel e a membrana de PVDF em um sistema de eletroforese próprio para transferência, no qual a corrente elétrica passa na horizontal.

Essa transferência ocorre em aproximadamente 20 horas, submersa em tampão de transferência (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Etanol 15%) em 80 mA e 250 V.

Após a transferência, a membrana secou em fluxo laminar por aproximadamente três horas. Os espaços que não continham proteínas foram preenchidos com solução de bloqueio (5% leite desnatado em TBS-T) incubando a membrana por 1 hora.

A seguir a membrana foi incubada com anticorpo primário (6X His monoclonal *Antibody* - Clontech) por uma hora, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-T (0,05% Tween 20 em TBS) e incubada com o anticorpo secundário conjugado com Fosfatase alcalina (*Phosphatase laber affinity perifer* - KPL) por mais uma hora. O processo de lavagem foi repetido por mais 3 vezes com TBS-T e uma vez com TBS (Tris 200 mM, NaCl 1,5 mM). A membrana foi incubada com solução reveladora (*anti-mouse*, conjugado com Fosfatase alcalina) até que a banda de interesse fosse revelada. Posteriormente a membrana foi lavada com água-Milli-Q e seca no fluxo laminar.

3.3.3 Purificação da proteína de interesse - Cromatografia por Afinidade

Segundo a análise do gel de eletroforese das diferentes etapas de expressão da proteína de interesse, elegeu-se a fração para ser submetida ao processo de purificação.

Como mencionado anteriormente, o pAE expressa a proteína de interesse em fusão 6 resíduos de histidinas na região N-Terminal, denominada *His-Tag*.

A proteína recombinante em fusão com a *His-Tag* facilita o processo de purificação, pois apresenta alta especificidade de ligação com metal imobilizado. Na coluna de Níquel-Sepharose, os íons metálicos são imobilizados por um agente

quelante capaz de disponibilizar o metal para a ligação com a proteína como demonstrado na figura 17.

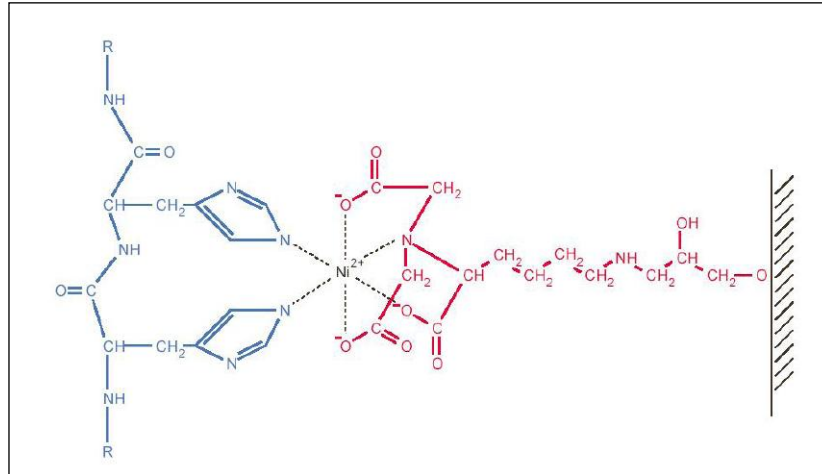


Figura 17. Interação entre resíduos vizinhos da cauda His-Tag e a matriz de Níquel-Sepharose. O quelante ácido nitrilotriacético (em vermelho) coordena-se com quatro das seis ligações no Níquel. Os dois sítios livres interagem com os anéis Imidazol da cauda de histidina das proteínas recombinantes (em azul) (Qiagen).

Uma coluna de cerca de 4 mL de resina IMAC-Sepharose (GE) foi montada em seringa de 10 mL, a resina estava previamente mantida em Etanol 20% a 4 °C. A coluna foi inicialmente lavada com 5 volumes de coluna (5V) de água milli-Q e em seguida foi carregada com 3V de solução de NiSO₄ 300 mM, permanecendo em repouso por cerca de 1 hora sendo em seguida carregada com mais 3V desta mesma solução. Após estar carregada com níquel a resina foi lavada com água Milli-Q (cerca de 5V) permanecendo pronta para o uso.

A coluna de Ni-Sepharose foi conectada a uma bomba peristáltica (Pump-P1 Pharmacia) e então equilibrada com 5V de Tampão A (Tris 100 mM pH 8,0; NaCl 300 mM; Imidazol 6 mM) em fluxo de 0,5 mL/min. Mantendo o mesmo fluxo a coluna foi carregada com 2 mL da Fração S1 tendo imediatamente dado início à coleta das frações (amostras de 0,5 mL/tubo; 1 tubo/min). Após esta etapa a coluna foi submetida inicialmente a lavagem com 3V de tampão B (Tampão A contendo 60 mM de Imidazol), seguido de 3V de tampão C (Tampão A contendo 400 mM de Imidazol) e mais 4V de tampão D (tampão A contendo 800 mM de Imidazol). Em todas estas etapas o fluxo foi mantido em 0,5 mL/min com frações 0,5 mL sendo coletadas e enumeradas. As análises foram realizadas por SDS-PAGE.

3.4 Clonagem - Sistema Eucarioto

A clonagem do inserto de interesse ao vetor de expressão em sistema eucarioto seguiu os mesmos parâmetros que a clonagem em vetor para sistema procarioto. Considerou-se também a análise do mapa de restrição e os sítios do vetor de expressão, neste caso, o pPIC9K.

Para obtermos a construção do vetor H06A09_pPIC9k partimos do clone proveniente da Biblioteca de cDNA dos complexos salivares das sanguessugas *H. depressa*. A partir destes clones, utilizando-se oligonucleotídeos específicos (Tabela 9) foram realizadas reações de PCR e os produtos amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição “*EcoRI* e *NotI*”, assim como o vetor pPIC9K. Após digestão o fragmento e o vetor foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1%, eluídos e então submetidos à uma reação de ligação em presença da enzima T4 DNA-ligase para obtenção da construção do clone H06A09_pPIC9K conforme exemplificado na figura 18.

Tabela 9 - Primers utilizados para a PCR do clone H06A09 para clonagem em *Pichia pastoris*.

H06A09	Foward	5' <u>GGATCCGAATTCC</u> AGGATGAGGAAGAGGGG3' <i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
	Reverse	5' <u>AAGCTTGCGGCCGCTT</u> ATTGGCAAGCATGAATATGA3' <i>HindIII</i> <i>NotI</i>
AOX	Foward	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'
	Reverse	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

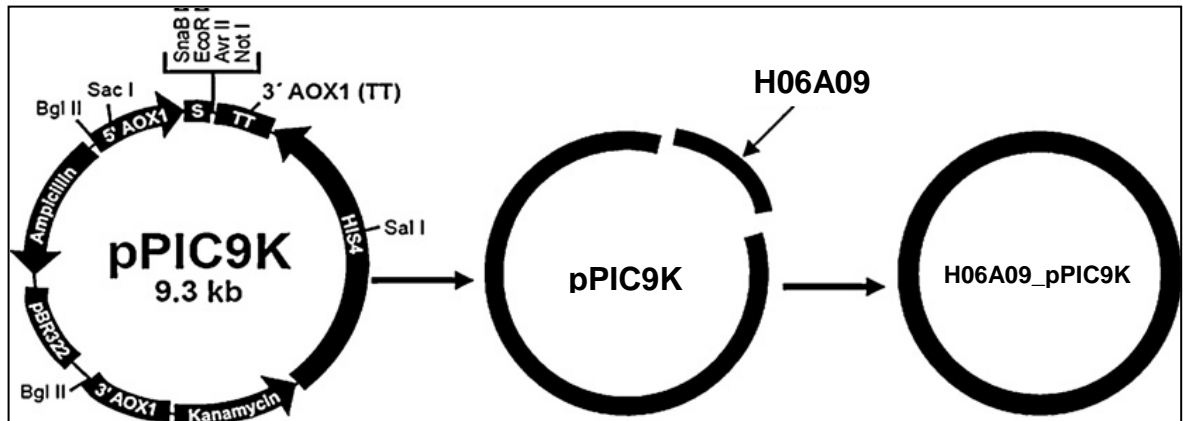


Figura 18. Esquema de construção do recombinante H06A09_pPIC9K.

O produto da ligação foi submetido a uma transformação por choque-térmico em bactérias cálcio-competentes DH5 α e plaqueados em meio 2xYT/Agar/ampicilina a 37°C *overnight*, devido à resistência conferida pelo vetor contra esse antibiótico para selecionar as colônias positivas.

As colônias crescidas em meio 2xYT/ágar foram, então, submetidas à reação em cadeia da Polimerase utilizando os oligonucleotídeos 5'AOX e 3'AOX para uma segunda confirmação das colônias positivamente transformadas.

Na reação de PCR com volume total de 50 μ L foram utilizados de 0,5 μ L (~15 ng) de DNA molde (água mais colônia), 5 μ L de buffer 10X (Tris-HCl 200 mM pH8.4, KCl 500 mM), 2 μ L MgCl₂ 50 mM, 1 μ L de dNTP (10 mM), 1 μ L do primer AOX 3' (20 pmol) (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 1 μ L do primer AOX 5' (20 pmol) (Invitrogen) e 2 Unidades de Taq DNA Polimerase platinum (Invitrogen, Brasil). As condições de ciclagem para confirmar a presença do fragmento de interesse incluíram uma desnaturação por 5 minutos a 94 °C, seguindo-se de 25 ciclos de 30 segundos para a temperatura de abertura das fitas (94 °C), 30 segundos para o anelamento dos primers a 50 °C e um minuto para extensão da enzima Polimerase (72 °C), após os ciclos, incubou-se por 5 minutos a 72 °C seguidos de manutenção a 4 °C - *Master cycler personal* (Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil). Os produtos foram analisados em gel de agarose 1%.

Foram selecionados cinco transformantes positivos que foram preparados para a transformação de leveduras *Pichia pastoris* linhagem GS115.

3.4.1 Preparo do DNA recombinante para transformação da *Pichia pastoris*

A transformação em *Pichia pastoris* é realizada pela incorporação do DNA plasmidial linearizado ao DNA genômico da levedura, portanto, inicialmente deve haver um preparo que consiste na obtenção de maior quantidade do plasmídeo por inóculo, crescimento e miniprep, seguidos da linearização com uma enzima de restrição. Através da análise do mapa de restrição e do mapa do vetor pPIC9K algumas possibilidades para linearização poderiam ser utilizadas, decidiu-se pela enzima *SacI*. Após obtenção de maior quantidade de DNA plasmidial, precipitou-se da seguinte forma: adicionando 10% de acetato de sódio 3M pH5,2, agitando vigorosamente, adicionando-se mais 3 volumes de Etanol absoluto e novamente agitando vigorosamente, centrifugando por 15 minutos, 13000 rpm a temperatura ambiente e descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se 250-500 μ L (300 μ L) de Etanol 70% seguido de centrifugação por mais 5 minutos, 13000 rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco por aproximadamente 20 minutos em estufa a 37 °C, o *pellet* seco foi ressuspenso em 10 μ L de água estéril.

A linhagem da levedura *Pichia pastoris* eleita para utilização no procedimento foi a GS115 (*his4*), patenteada pela Invitrogen, esta linhagem possui mutação no gene histidinol desidrogenase (*his4*), o que as impede de sintetizar o aminoácido histidina.

3.4.2 Transformação de *Pichia pastoris*

Após a obtenção de grande quantidade de plasmídeo linearizado e precipitado, foi feita a transformação em *Pichia pastoris* – GS115. Essa transformação consistiu em adicionar o DNA precipitado e aproximadamente 80 μ L de levedura competente preparada em uma cubeta própria para eletroporação (0,2 cm - Biorad) mantida previamente no gelo, que recebeu em seguida um pulso de 1,5 kV com capacitância de 25 μ F em eletroporador (Gene Pulser II - Biorad). Após este procedimento foi adicionado 1 mL de Sorbitol 1M estéril e gelado. O material foi retirado da cubeta e plaqueado em placas MD (1,34% YNB; 4×10^{-5} % biotina; 2% dextrose, 1,5% Agar), as placas foram mantidas por aproximadamente 48 h a 30 °C, para visualização do crescimento das colônias.

Após o crescimento das colônias, uma reação de PCR utilizando oligonucleotídeos AOX foi realizada para confirmação dos clones positivos para dar-se prosseguimento ao protocolo de expressão.

3.5 Expressão da Proteína Recombinante – Sistema Eucarioto

Para padronização do melhor protocolo de expressão foi realizada uma busca de melhores condições, para tanto, foram utilizadas diferentes condições como meios de cultura, concentração do indutor, tempo e temperatura de crescimento e indução de expressão.

O crescimento da colônia contendo o clone H06A09_pPIC9K em *Pichia pastoris*-GS115, iniciou-se através de um pré-inóculo cultivado em 5 mL de meio BMGY (Tabela 10) em tubo cônico 50 mL, sob temperatura de 28 °C e agitação de 350 rpm por aproximadamente dois dias. Após esse período foi preparado o lote semente, assim a cada expressão protéica utilizou-se a mesma colônia. Alíquotas do lote semente foram feitas utilizando-se 200 µL de Sorbitol 1 M estéril e 200 µL do pré-inóculo, estes foram armazenados a -80 °C.

Tabela 10 - Reagentes para o preparo dos meios de cultura para levedura

Reagentes	Meio BMGY	Meio BMG
Extrato de Levedura	1%	-
Peptona	2%	-
Fosfato de Potássio pH7,0	100 mM	100 mM
YNB	1,34%	1,34%
Biotina	4×10 ⁻⁵ %	4×10 ⁻⁵ %
Glicerol ou Metanol	1% / 0,5%	1% / 0,5%

Para o pré inóculo da expressão, utilizou-se os 400 µL do lote semente em 50 mL de meio BMGY em um erlenmeyer de 500 mL, nas mesmas condições anteriores, até que atingissem uma DO₆₀₀ 3,0 em cerca de 24 horas.

Após o crescimento, todo o pré inóculo foi transferido para um erlenmeyer de 1L e adicionado mais 50 mL de meio BMGY ou BMG (100 mM fosfato de potássio pH 6,0, 1,34% YNB, 4×10⁻⁵% biotina, 1% glicerol ou diferentes concentrações de

metanol), algumas condições de crescimento foram testadas (diferentes temperaturas (28 a 30 °C); diferentes rotações para agitação (260-350 rpm).

Ambos os meios de cultura para crescimento da levedura continham glicerol que é utilizado como fonte de carbono para alimentação do microorganismo, sua presença é medida periodicamente durante a fase de crescimento da levedura (Sistema enzimático para determinação das Triglicérides no plasma ou soro – Triglicérides Enzimático Líquido - [®]Doles), após a finalização dos níveis de glicerol do meio adicionou-se metanol passando da fase de crescimento para a fase de indução protéica, este indutor foi testado em diferentes concentrações 0,5% - 2% (500 µL). O Metanol além de também ser fonte de carbono é capaz de induzir a expressão protéica já que promove a ativação dos Genes AOX (Figura 12), para sua metabolização. Neste momento colheu-se amostras de 1 mL (T0) para verificação da expressão protéica basal.

A cultura foi alimentada a cada 24 horas com as taxas de metanol determinadas e eram colhidas amostras de 1 mL da cultura para verificar andamento da expressão. Outro fator que foi variado foi tempo de indução com metanol (24 a 120 h) para determinar-se o melhor protocolo para padronização.

Após o período de expressão, a cultura foi centrifugada 1500 g, 20 minutos a 4 °C. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante foi armazenado em freezer -80 °C para aguardar o processo de purificação.

3.5.1 Precipitação protéica por metanol/clorofórmio

Este protocolo foi utilizado para melhor visualização do perfil de expressão em SDS-PAGE (metodologia descrita no item 3.3.1) de acordo com Wessel e Flügge, 1984. As amostras colhidas periodicamente durante a expressão protéica foram precipitadas utilizando metanol e clorofórmio. Em um tubo cônico foi adicionado à amostra quatro vezes o seu volume de metanol e submetida à forte agitação por aproximadamente trinta segundos. Foi adicionado mais um volume de clorofórmio e submeteu-se a agitação vigorosa nas mesmas condições, adicionou-se então três volumes de água agitando-se novamente. Centrifugou-se por 5 minutos a 4000 g, a 4 °C, seguidos da remoção da parte superior aquosa com auxílio da pipeta. Adicionou-se quatro volumes de metanol seguidos de forte agitação. Centrifugou-se

novamente nas mesmas condições. Ao final removeu-se o máximo de líquido cuidadosamente (sem tocar no *pellet*), a amostra foi então seca no vapor de N₂ ou estufa e ressuspensa com tampão de amostra para aplicação em SDS-PAGE.

Nos itens subseqüentes estarão relatadas as diferentes estratégias traçadas para busca das melhores condições para purificação da proteína expressa em *P.pastoris*.

3.5.2 Quantificação protéica

Para estimar a concentração protéica utilizamos dois distintos métodos dependendo da etapa.

A técnica utilizada durante os processos de purificação foi o de leitura em densidade óptica em comprimento de onda de 280 nm (DO₂₈₀), assumindo-se a estimativa de um valor de 1,0 mg/mL de proteína para soluções que apresentem leitura de absorvância de 1,0. Este método é baseado no fato que a absorção nesse comprimento de onda e em 280 nm devido a diversos aminoácidos (fenilalanina, cisteína, cistina, metionina, triptofano, histidina e tirosina) que contém anéis aromáticos (Stoscheck, 1990).

A determinação quantitativa de proteínas utilizada durante os ensaios de atividade e caracterização foi o desenvolvido por Bradford, em 1976, onde se utiliza uma curva sérica de albumina bovina como padrão e leitura em densidade óptica em comprimento de onda de 595 nm, devido à interação do corante BG-250 com cadeias laterais dos aminoácidos básicos ou aromáticos ocorrendo um deslocamento do corante para a forma aniônica, que é absorvido neste comprimento de onda (Bradford, 1976).

3.6 Estratégias para Purificação da Proteína recombinante

As amostras colhidas periodicamente durante a expressão protéica foram preparadas de acordo com o protocolo de precipitação com metanol/clorofórmio e posteriormente aplicado em SDS-PAGE 12,5%.

3.6.1 Concentração e diálise por ultrafiltração tangencial

Após a expressão, o sobrenadante foi concentrado e dialisado utilizando o sistema de ultrafiltração Ultra-Amicon (Millipore) com poro de 5 kDa, seguindo centrifugações sucessivas conforme o manual do fabricante.

Nesta fase foi testada também com sistema de ultrafiltração a primeira estratégia para isolamento da proteína recombinante, na qual o Sobrenadante da expressão concentrado em Ultra-Amicon de 5 kDa foi filtrado em membrana com poros de 30 kDa (Ultra-Amicon- Millipore). A separação foi obtida pela centrifugação a 4.000 rpm, a 4 °C durante quinze a vinte minutos. O material filtrado foi novamente concentrado em Ultra-Amicon de 5 kDa e o resultado visualizado em SDS-PAGE.

3.6.2 Liofilização

A liofilização foi uma alternativa para concentração das amostras em algumas fases do trabalho. O material previamente mantido em freezer -80 °C foi submetido ao processo de liofilização por aproximadamente 18 horas. Este procedimento foi realizado no LETA (Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada) do Instituto Butantan.

3.6.3 Precipitação com sulfato de Amônio – salting out

O sobrenadante da expressão foi submetido à precipitação fracionada com o sal nas concentrações de 5 - 50%. Após a adição da solução saturada de sulfato de amônio, a amostra foi incubada a aproximadamente 16 °C em duas diferentes condições: com agitação e sem agitação por 18 horas. Após a incubação, a amostra foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C e a análise do resultado foi visualizado em gel de SDS-PAGE com as amostras dialisadas.

3.6.4 Cromatografia em Gel Filtração

Como estratégias de gel filtração foram utilizadas duas resinas, Superdex 200 e Superdex 75 (GE Healthcare, São Paulo, SP, Brasil), ambas eram acopladas no sistema FPLC - FPLC System (Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). As amostras aplicadas eram provenientes da concentração por Ultra-Amicon,

centrifugadas por 10 minutos a 14 000 rpm e a coluna previamente equilibrada com dois volumes do tampão (50 mM fosfato de potássio pH 6,0; 150mM NaCl, pH 7,0). A cromatografia foi realizada a temperatura ambiente, sendo as frações, incubadas em gelo após sua coleta.

As cromatografias utilizando as colunas Superdex 200 e coluna Superdex 75 tiveram um fluxo de 0,5 mL/min. A eluição protéica foi monitorada através da leitura de A_{280} .

As massas moleculares dos picos coletados das corridas de gel filtração puderam ser estimadas usando padrão protéico previamente cromatografado: Dextran Blue - 2000 kDa; Lisozima - 14,3 kDa; Tripsinogênio - 24 kDa; Ovoalbumina - 45 kDa.

A cromatografia em Superdex 75 teve diferentes estratégias de coleta de picos testadas, estas estratégias estarão melhor explicadas nos Resultados.

3.6.5 Cromatografia em Troca Iônica

Foi utilizada a resina Mono Q (Pharmacia-Biotech) em coluna de 1 mL. A coluna foi acoplada no sistema FPLC. A cromatografia foi realizada a temperatura ambiente, com fluxo de 1 mL/min, sendo as frações, incubadas em gelo após sua coleta e a eluição protéica foi monitorada através da leitura de A_{280} .

As amostras aplicadas nesta etapa foram provenientes da concentração por Ultra-Amicon, centrifugadas por 10 minutos a 14000 rpm e a coluna previamente equilibrada com dois volumes do tampão A (Tris 20 mM pH7,0), a eluição das amostras foram feitas com gradiente linear de NaCl (0 - 1M) a 0,5 mL/min por 50 minutos e as frções correspondentes os picos incubados em gelo logo após a coleta manual.

3.6.6 Cromatografia em Fase Reversa

A fração com atividade proveniente da cromatografia em gel filtração em Superdex 75 foi submetida à cromatografia em fase reversa C-18 em sistema HPLC. A eluição protéica foi monitorada através da leitura em A_{214} , A_{220} e A_{280} . Após a coleta as amostras foram mantidas em gelo.

A coluna foi carregada com 250 µg da amostra. Um gradiente linear de solvente A (Ácido trifluoroacético TFA 0,1% em água) e solvente B (Acetonitrila 90% v/v + 10% solvente A) foi utilizado. O gradiente foi estabelecido entre 0 e 100% do solvente B por 20 minutos e os picos eluídos a 1 mL/min foram coletados manualmente.

3.6.7 Cromatografia de Afinidade – Heparina-Sepharose

A fração com atividade proveniente da cromatografia em gel filtração em Superdex 75 foi submetida à cromatografia de afinidade em resina Heparina-Sepharose, sistema FPLC, onde foi monitorada através da leitura em A_{280} .

A coluna foi carregada com 200 µL da amostra (200 µg) em tampão A (Tris 20 mM, pH7,0) e um gradiente linear entre 0 e 100% de tampão B (Tris 20 mM, NaCl 1M, pH7,0) foi utilizado por 55 minutos e os picos eluídos no fluxo de 0,3 mL/min foram coletados manualmente. Após a coleta as amostras foram mantidas em gelo.

3.7 Sequenciamento do N-terminal

Para o seqüenciamento da proteína de interesse, a banda protéica foi recortada do gel de SDS-PAGE e eluída. Uma amostra de 500 µL da expressão finalizada foi precipitada por metanol/clorofórmio e submetida a eletroforese unidimensional em gel de SDS-PAGE 15%. Após a separação, a borda da raia onde a amostra foi corrida foi recorada e corada por prata para saber exatamente a localização da banda de interesse. A banda foi recortada, macerada e incubada em NaCl 10 mM por 2 horas em agitação para eluição da proteína de interesse.

Com a amostra eluída, esta foi submetida a uma cromatografia de fase reversa (Coluna C-18) acoplada ao sistema HPLC (Shimadzu 20A – Diode Array Detector) para purificação e certificação da retirada de sal antes de ser submetido ao seqüenciamento.

O seqüenciamento do N-terminal foi determinado pela degradação de Edman utilizando o seqüenciador de Proteínas (Shimadzu PPSQ-21). Este ensaio foi realizado no Laboratório de Sequenciamento Multiusuário do Instituto Butantan.

3.8 Deglicosilação da Proteína Recombinante

Um total de 20 µg da proteína recombinante expressa em *Pichia* foi incubada inicialmente com um tampão de desnaturação 10X (SDS 0,5% DTT 0,4M) e por dez minutos a 100 °C. Após o aquecimento, foi adicionado Tampão de reação 10X (Citrato de Sódio 0,5 M, pH 5,5) e 3 µL da enzima Endo H_f ([®]BioLabs 1.000,000 U/mL) e incubado por 3 horas a 37 °C. Após a reação, foi adicionado tampão de amostra e esta foi submetida à eletroforese em SDS-PAGE 15% e corado por AgNO₃ como descrito anteriormente.

3.9 Atividade em Testes de Agregação Plaquetária

Os testes foram realizados com amostras das diferentes etapas de purificação utilizando sangue total, PRP (plasma rico em plaquetas) ou plaquetas lavadas. Para tais ensaios foi obtida a aprovação da Comissão de Ética Humana (Parecer 886/CEP).

Para utilização de sangue total, foi coletado sangue venoso humano de doadores saudáveis (9 mL), em tubo plástico contendo 1 mL de Citrato de sódio 3,8%, e levemente agitado. Para os ensaios, 500 µl do sangue coletados acrescidos de 500 µl de salina, foram pré-incubados em diferentes tempos (10 e 30 minutos) com diferentes concentrações da proteína recombinante (15 e 30 µg/teste). Após esse período, a agregação foi induzida com o colágeno como agonista.

Para ensaios com PRP foi coletado sangue venoso humano de doadores normais (9 mL), em tubo plástico contendo 1 mL de Citrato de sódio 3,8 %, centrifugado durante 15 minutos a 1000 rpm em temperatura ambiente sem tampa para a obtenção do PRP. O PRP foi separado e o sangue novamente centrifugado (3500 rpm, 15 minutos) para obtenção de PPP (plasma pobre em plaquetas), onde ambos são lidos em contador de células (Advia 60) e usados para a diluição do PRP ajustando-o para uma concentração de 300×10^9 plaquetas/L. Para os ensaios de agregação, 500 µl desta solução de PRP foram pré-incubados por 10 minutos a 37 °C. Após este período, a agregação foi induzida com a adição do agonista na presença e ausência da proteína recombinante. Os agonistas utilizados foram Colágeno (2,5 µg/mL), ADP (0,75 µM), Ácido Araquidônico (1 mM) e Ristocetina (1mg/mL).

Para testes com plaquetas lavadas, as mesmas foram obtidas a partir do PRP e para cada 9 mL de PRP foi adicionado 1 mL de EDTA 2% e centrifugado durante 15 minutos, 2000 rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensão lentamente em 10 mL de tampão de lavagem (NaCl 140 mM, NaHCO₃ 10 mM, KCl 2,5 mM, Na₂HPO₄ 0,49 mM, MgCl₂ 1 mM, Citrato de Sódio 2 mM, BSA 52,23 mM, dissolvidos em 100 mL de H₂O, pH ajustado para 6,5 com HCl) e submetido à centrifugação novamente nas mesmas condições. O procedimento com o tampão de lavagem foi realizado uma segunda vez e o sobrenadante novamente descartado e o *pellet* foi ressuspensão cuidadosamente em 2 mL de tampão Tyrode (CaCl₂ 1 mM, NaCl 134 mM, NaHCO₃ 12 mM, KCl 2,9 mM, Na₂HPO₄ 0,34 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM pH ajustado para 7,4 com HCl) contendo glicose 1%, e a concentração de plaquetas ajustada para 300 x 10⁹ plaquetas/L. Para os ensaios de agregação, 500 µl de solução de plaquetas lavadas foram pré-incubados por 10 minutos a 37 °C. Após este período, a agregação foi induzida com os agonista na presença e ausência da proteína recombinante. Nos ensaios com plaquetas lavadas foram utilizados: Colágeno (2,5 µg/mL), ADP (0,75µM), Ácido Araquidônico (1 mM), Ristocetina (0,5 mg/mL) e Trombina (1 U/mL) como agonistas.

O agregômetro (Chrono-Log) foi previamente calibrado para 100% de transmitância com a solução de PPP em ensaios com PRP e Tyrode para ensaios com plaqueta lavada.

3.10 Atividade sobre receptores plaquetários - Citometria de Fluxo

A metodologia para estudos de receptores plaquetários por citometria de fluxo em plaquetas lavadas foi seguida conforme a descrita por Shattil et al. (1987) e Warkentin et al. (1990), sob condições de mínima ativação. Os testes foram realizados com 20 µl do PRP e 20 µl de plaquetas lavadas (protocolo citado acima), estes foram pré-incubados com a proteína recombinante por 30 minutos a temperatura ambiente, após esse período 40 µl de tampão fosfato salina (PBS) com Soro Fetal Bovino (SFB) 10% e 2,5 µl de concentrações saturantes de anticorpos monoclonais FITC ou PE - conjugados (BD) foram adicionados e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após esse período, 300 µl de

paraformaldeído 1% foi adicionado e os tubos submetidos à citometria de fluxo. Foi utilizado o citômetro Guava Modelo Easycyte (GE).

Para tal metodologia a solução de plaquetas suspensas marcadas com os fluoróforos conjugados com FITC e PE passam através de uma câmara que contém um foco de laser a uma velocidade de 1.000 á 10.000 células por minuto. Após a ativação fluorescente até o comprimento de onda de excitação, um detector processa a fluorescência emitida e as propriedades de luz de cada célula são medidas (Michelson et al., 1996)

Os resultados gerados foram referentes a 10.000 eventos, e como controle de inespecificidade foi utilizado um anticorpo monoclonal irrelevante (isotipo). Os receptores plaquetários foram marcados com os seguintes anticorpos monoclonais:

- Isotipo FITC / PE
- CD42b-FITC para GPIb
- CD49b-FITC para α_2 ($\alpha_2\beta_1$)
- CD29-PE para β_1 ($\alpha_2\beta_1$)
- CD41a-FITC para GPIIb
- CD62P-FITC para P-selectina
- CD36 – FITC para GPIV

Para a análise estatística dos resultados obtidos, comparando o grupo das amostras incubadas e não incubadas com a proteína de interesse foi utilizado o teste – *t*, assumindo o nível de significância de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sistema procarioto

4.1.1 Mapa de restrição do clone H06A09

A seqüência do clone H06A09 foi submetida ao programa Webcutter 2.0, e assim obtivemos o seu Mapa de Restrição o qual define as enzimas de restrição capazes e não capazes de clivar a seqüência de interesse. O Mapa de Restrição - H06A09- está apresentado na Figura 19.

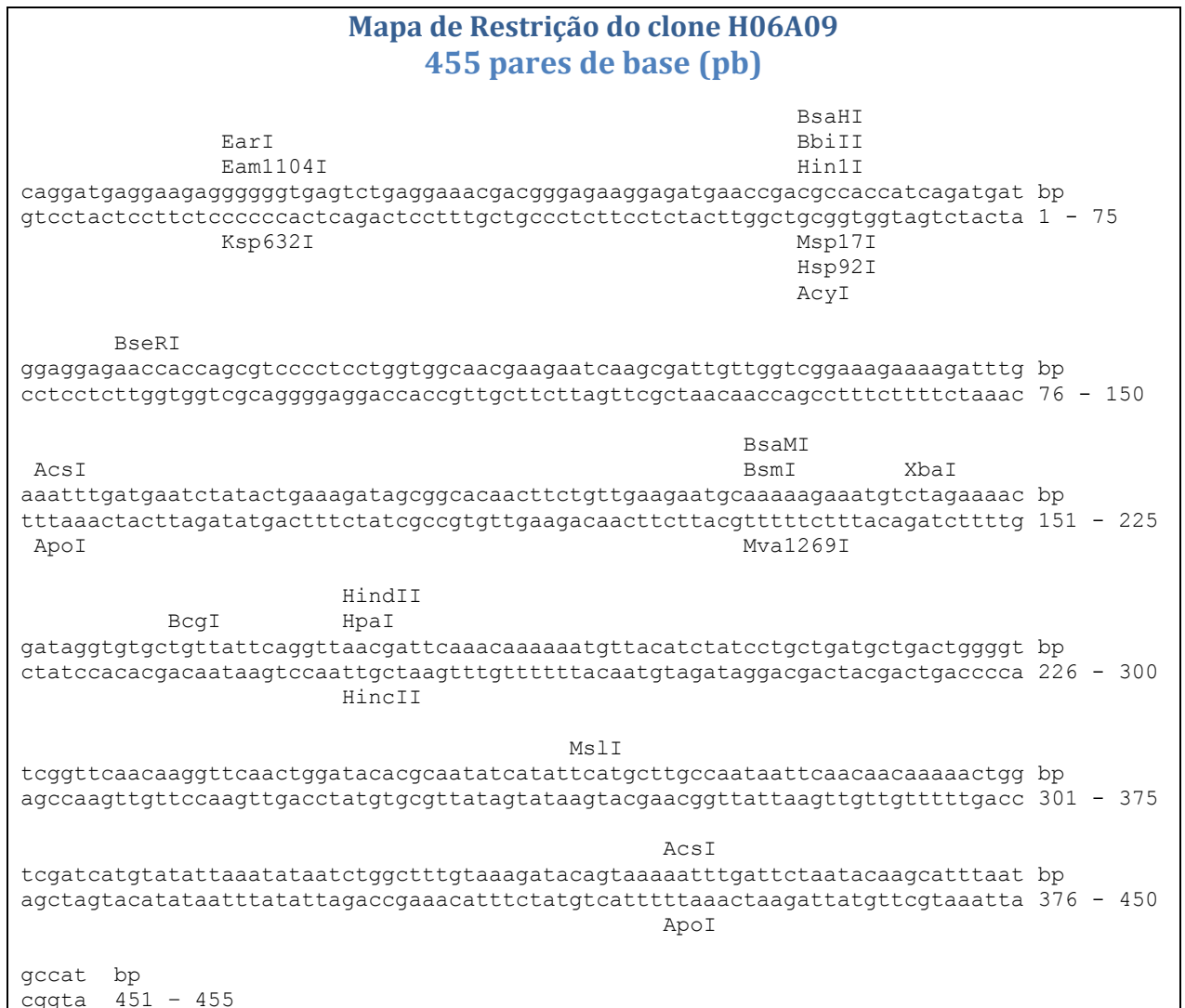


Figura 19. Mapa de Restrição do transcrito H06A09

Na Figura 20 podemos observar todas as endonucleases que não são capazes de digerir a seqüência do nosso clone de interesse, assim, decidimos por utilizar as enzimas *Hind* III e *Bam*H I para o clone H06A09 na estratégia de clonagem em vetor pAE e que se encontram em destaque.

Endonucleases que não digerem a seqüência de interesse:

AatI, AatII, Acc113I, Acc16I, Acc65I, AccB1I, AccB7I, AccBSI, AccI, AccIII, AclNI, AfeI, AflII, AflIII, AgeI, AhdI, Alw21I, Alw44I, AlwNI, Ama87I, AocI, Aor51HI, ApaI, ApaLI, AscI, AseI, AsnI, Asp700I, Asp718I, AspEI, AspHI, AspI, AtsI, AvaI, AviII, AvrII, BalI, **BamHI**, BanI, BanII, BanIII, BbeI, BbrPI, BbsI, BbuI, Bbv12I, Bbv16II, BclI, BcoI, BfrI, BglI, BglII, BlnI, BlpI, BpiI, BpmI, Bpu1102I, Bpu14I, BpuAI, Bsa29I, BsaAI, BsaBI, BsaI, BsaOI, BsaWI, BscI, Bse118I, Bse21I, Bse8I, BseAI, BseCI, BsePI, BsgI, Bsh1285I, Bsh1365I, BshNI, BsiEI, BsiHKAI, BsiI, BsiMI, BsiWI, BsmBI, BsoBI, Bsp106I, Bsp119I, Bsp120I, Bsp13I, Bsp1407I, Bsp143II, Bsp1720I, Bsp19I, Bsp68I, BspCI, BspDI, BspEI, BspHI, BspLU11I, BspMI, BspTI, BspXI, BsrBI, BsrBRI, BsrDI, BsrFI, BsrGI, BssAI, BssHII, BssSI, BssTI, Bst1107I, Bst98I, BstBI, BstD102I, BstDSI, BstEII, BstH2I, BstI, BstMCI, BstPI, BstSFI, BstSNI, BstX2I, BstXI, BstYI, BstZI, Bsu15I, Bsu36I, CciNI, CelII, Cfr10I, Cfr42I, Cfr9I, CfrI, ClaI, CpoI, Csp45I, CspI, CvnI, DraI, DraII, DraIII, DrdI, DsaI, EaeI, EagI, Eam1105I, Ecl136II, EclHKI, EclXI, Eco105I, Eco130I, Eco147I, Eco24I, Eco255I, Eco31I, Eco32I, Eco47III, Eco52I, Eco57I, Eco64I, Eco72I, Eco81I, Eco88I, Eco91I, EcoICRI, EcoNI, EcoO109I, EcoO65I, EcoRI, EcoRV, EcoT14I, EcoT22I, EheI, ErhI, Esp1396I, Esp3I, FauNDI, FbaI, FriOI, FseI, FspI, GsuI, HaeII, **HindIII**, KasI, Kpn2I, KpnI, Ksp22I, KspI, LspI, MamI, MfeI, MflI, MluI, MluNI, Mph1103I, MroI, MroNI, MscI, MspA1I, MspCI, MunI, NaeI, NarI, NcoI, NdeI, NgoAIV, NgoMI, NheI, NotI, NruI, NsiI, NspBII, NspI, NspV, PacI, PaeI, PaeR7I, Pfl23II, PflMI, PinAI, Ple19I, PmaCI, Pme55I, PmeI, PmlI, Ppu10I, PpuMI, PshAI, PshBI, Psp124BI, Psp1406I, Psp5II, PspAI, PspALI, PspEI, PspLI, PspOMI, PstI, PstNHI, PvuI, PvuII, RcaI, RsrII, SacI, SacII, SalI, SapI, SbfI, ScaI, SexAI, SfcI, SfiI, Sfr274I, Sfr303I, SfuI, SgfI, SgrAI, SmaI, SmiI, SnaBI, SpeI, SphI, SplI, SrfI, Sse8387I, SseBI, SspBI, SspI, SstI, SstII, StuI, StyI, SunI, SwaI, Tth111I, Van91I, Vha464I, VneI, VspI, XcmI, XhoI, XhoII, XmaI, XmaIII, XmnI, Zsp2I

Figura 20. Enzimas de restrição que não clivam a seqüência do clone H06A09. As enzimas eleitas para utilização na clonagem em vetor pAE encontram-se em destaque.
Fonte: Max, 2008.

A estratégia de clonagem foi definida e está resumidamente apresentada na figura 21.

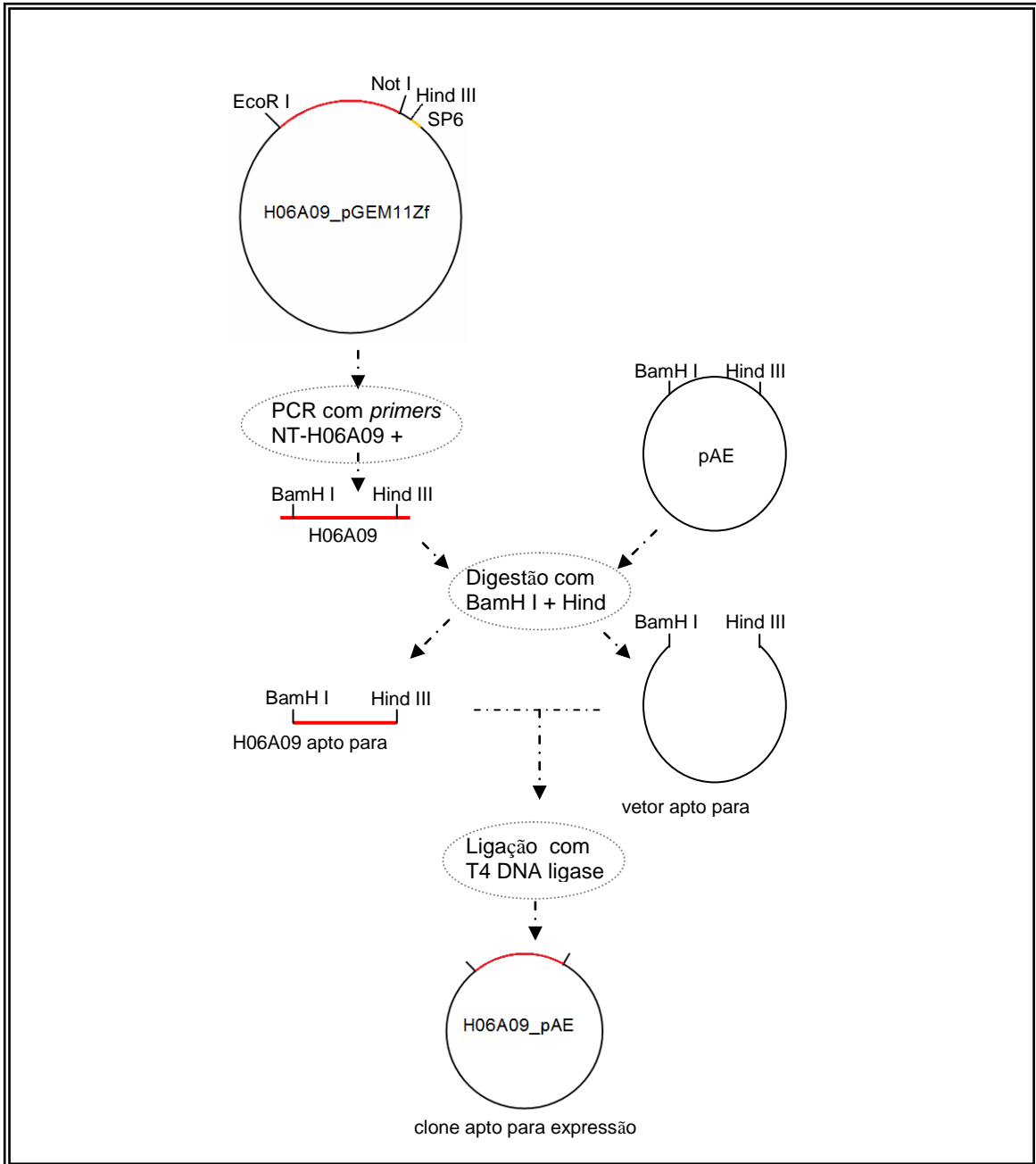


Figura 21. Estratégia para clonagem do transcrito H06A09 em vetor pAE.

Como proposta inicial do trabalho decidiu-se expressar a proteína de interesse em sistema procarioto *E. coli*, a seguir estarão demonstrados os resultados obtidos durante estas etapas.

4.1.2 Miniprep do H06A09_pGEM11Zf

Pode-se visualizar na figura 22 o resultado da purificação do isolamento do plamídeo H06A09_pGEM11Zf proveniente da biblioteca de cDNA.

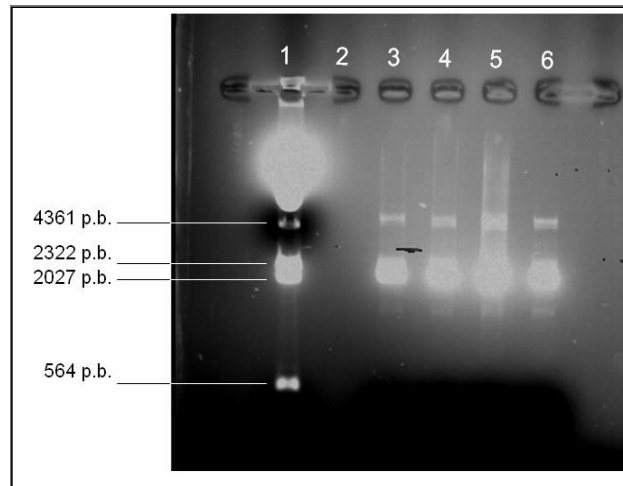


Figura 22. Miniprep – H06A09_pGEM 11Zf – Eletroforese em gel de Agarose 1% corado com Brometo de Etídio: (1) padrão λ DNA/Hind III com os fragmentos indicados na figura. As minipreps dos clones de interesse se encontram nas colunas 3, 4, 5 e 6.

4.1.3 PCR do H06A09 com oligonucleotídeos NT-H06A09 e SP6

Para confirmação de que o plasmídeo extraído pela miniprep continha o inserto esperado foi realizado uma PCR com os oligonucleotídeos direcionados. A figura 23 apresenta a amplificação de um inserto de cerca de 500pb proveniente da PCR realizada com os oligonucleotídeos NT-H06A09 e SP6, como esperávamos.

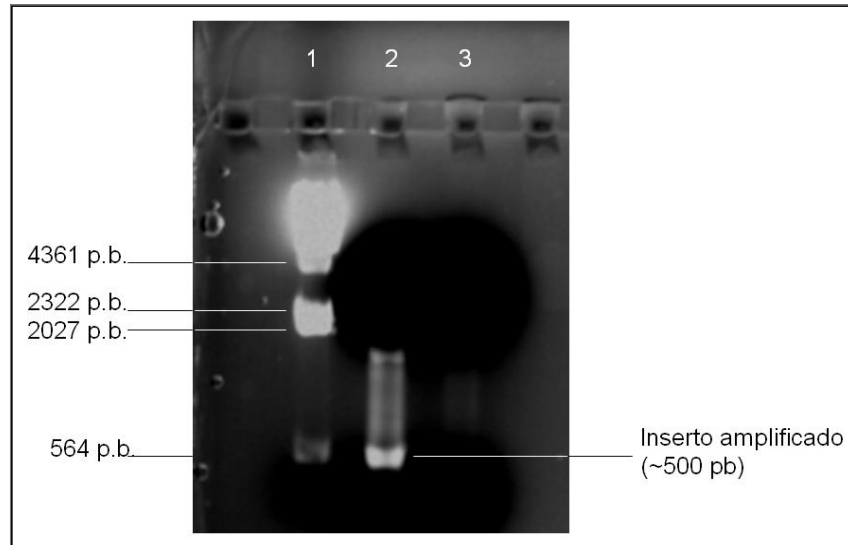


Figura 23. PCR do clone eleito – Eletroforese em gel de Agarose 1% corado com Brometo de Etídio: (1) padrão λ DNA/Hind III com os fragmentos indicados na figura. (2) Produto de PCR (~500pb); (3) controle negativo da PCR.

4.1.4 Digestão Enzimática do Insero H06A09 e do vetor pAE

Tanto o vetor pAE quanto o produto da amplificação do PCR referente ao clone H06A09 foram submetidos à digestão enzimática com as enzimas de restrição: *HindIII* e *BamHI*. As Figuras 24 e 25 apresentam o resultado em gel de agarose 1% das digestões do vetor (pAE) e do insero (H06A09), respectivamente.

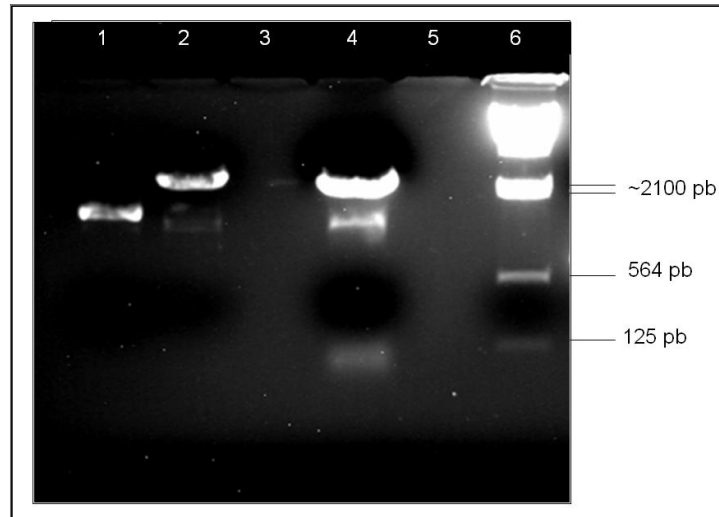


Figura 24. Digestão do plasmídeo pAE – Eletroforese em gel de Agarose 1% corado com Brometo de Etídio: (1) pAE não digerido; (2) pAE digerido com Hind III; (4) pAE digerido com Hind III e BamHI; (6) padrão λ DNA/Hind III com os fragmentos indicados na figura.

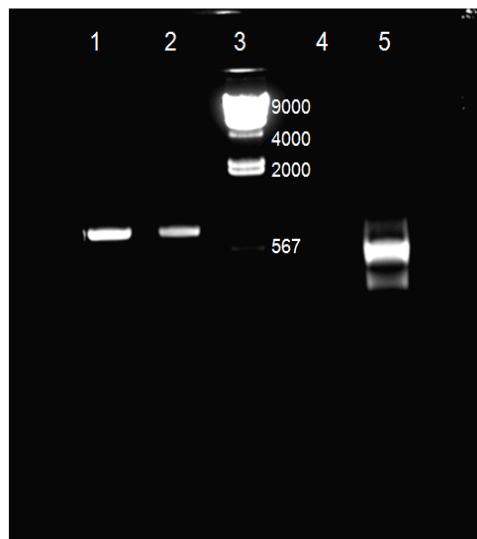


Figura 25. Digestão do clone eleito H06A09 – Eletroforese em gel de Agarose 1% corado com Brometo de Etídio: (1) inserto não digerido; (2) inserto digerido com Hind III; (3) padrão λ DNA/Hind III; (5) inserto digerido com Hind III e BamH I.

4.1.5 Ligação do inserto ao vetor pAE

O material obtido da digestão do plasmídeo e do inserto foram submetidos à reação de ligação e esta foi confirmada a partir do plaqueamento após transformação de bactérias DH5 α em meio sólido 2xYT-Agar/ampicilina.

Na teoria apenas os clones com a ligação correta deveriam apresentar colônias crescidas na placa contendo o antibiótico ampicilina. No entanto, após o crescimento das bactérias em meio sólido 2xYT/amp, 08 colônias foram selecionadas e submetidas à reação de PCR para confirmação das colônias positivas e o produto de amplificação da PCR pode ser visualizado na Figura 26.

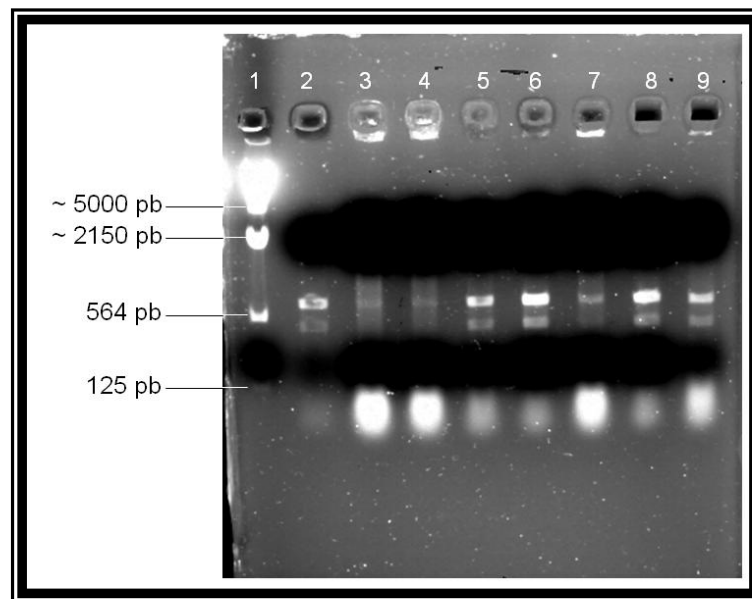


Figura 26. PCR de 8 colônias selecionadas da placa de transformação. Eletroforese em gel de Agarose 1% corado com Brometo de Etídio: (1) Padrão de massa molecular λ DNA/Hind III com valores indicados na figura; (2 – 9) PCR dos Inóculo.

Conforme podemos notar na Figura 26, das 08 colônias selecionadas, apenas as colônias aplicadas nos poços 2, 5, 6, 8 e 9 tiveram a amplificação do produto do tamanho esperado. Dessas colônias positivas foram eleitas 4, que por sua vez foram submetidas a miniprep com resultado visualizável na Figura 27.

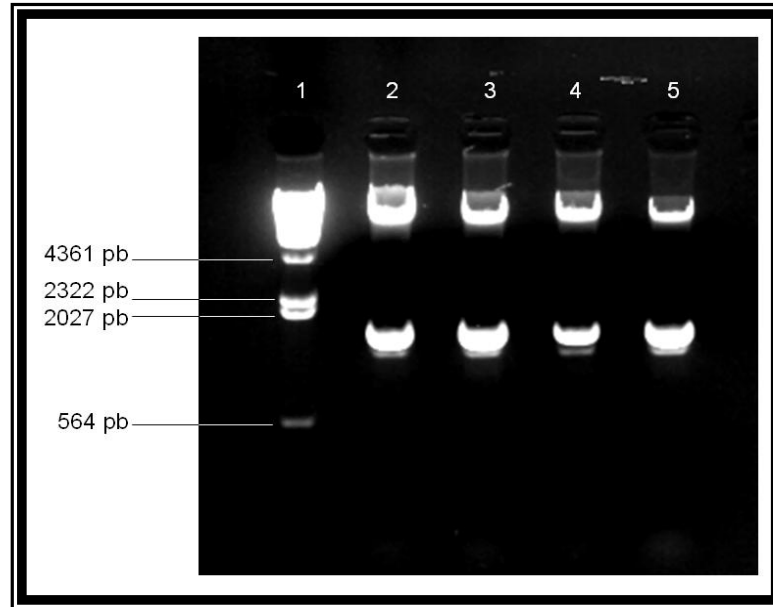


Figura 27. Miniprep de colônias positivas eleitas para PCR - Eletroforese em gel de Agarose 1% corado com Brometo de Etídio. (1) Padrão de massa molecular λ DNA/Hind III com valores indicados na figura; (2-5) Miniprep das colônias.

4.1.6 Confirmação da seqüência do H06A09_pAE

Os quatro clones foram submetidos à reação de seqüenciamento e todos obtiveram seqüências de boa qualidade condizentes ao seqüenciamento anterior (Faria et al., 2005). Demos então continuidade na etapa de expressão protéica com um destes clones.

4.1.7 Expressão da Proteína Recombinante

A expressão da proteína recombinante foi feita a partir do pré-inóculo das colônias (H06A09_pAE) resultantes da transformação de células de *E.coli*, linhagem BL21D3.

Após o processo de crescimento, indução da expressão, rompimento celular e solubilização dos corpúsculos de inclusão as amostras foram submetidas à SDS-PAGE 12,5% com redução, corada com *Coomassie-Blue*, visualizada na figura 28. Em destaque na Figura 28 está marcada uma banda protéica com massa molecular aproximada à esperada (~13 kDa) encontrada na fração solúvel (S1) do procedimento de lise celular.

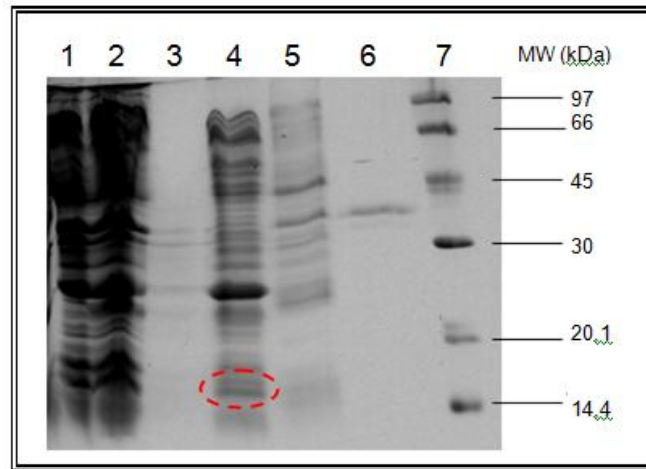


Figura 28. Etapas de expressão da proteína em *E. coli* linhagem BL21D3 – Eletroforese em gel de SDS-PAGE 12,5% corado com coomassie-blue: (1) cultura antes da indução gênica (T0); (2) *pellet* com três horas de indução (T3); (3) sobrenadante com três horas de indução (S0); (4) *pellet* lisado (S1); (5 e 6) *pellets* solubilizados (S2 e S3 respectivamente); (7) Padrão de massa molecular indicados ao lado.

4.1.8 Etapa de Purificação

Para termos a certeza de qual fração continha a proteína de interesse em fusão com a *His-Tag*, realizamos dois procedimentos, um *western blotting* com o anticorpo anti-*His-Tag*, e submetemos a cromatografia em Ni-Sepharose o material proveniente da fração solúvel S1 (apresentado no poço 4 da figura 27).

A eluição da proteína da cromatografia em Ni-Sepharose foi realizada com tampões contendo diferentes concentrações de Imidazol (60 mM, 400 mM e 800 mM) e frações de 0,5 mL foram coletadas. Após a coleta das frações, algumas amostras foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 15 % em condições redutoras e o gel foi corado por AgNO_3 .

A Figura 29 apresenta o perfil de frações eluídas com 60 mM e 400 mM de Imidazol, um outro gel foi realizado apenas com amostras eluídas com 800 mM, mas como não apresentou nenhuma banda corada por AgNO_3 , dados não mostrados. Nesta figura podemos visualizar que existe mais de uma banda protéica sendo eluída com 400 mM de Imidazol (colunas 11 a 15), sendo que a banda majoritária apresenta aproximadamente 20 kDa (indicada pela seta), diferente do esperado (~13 kDa).

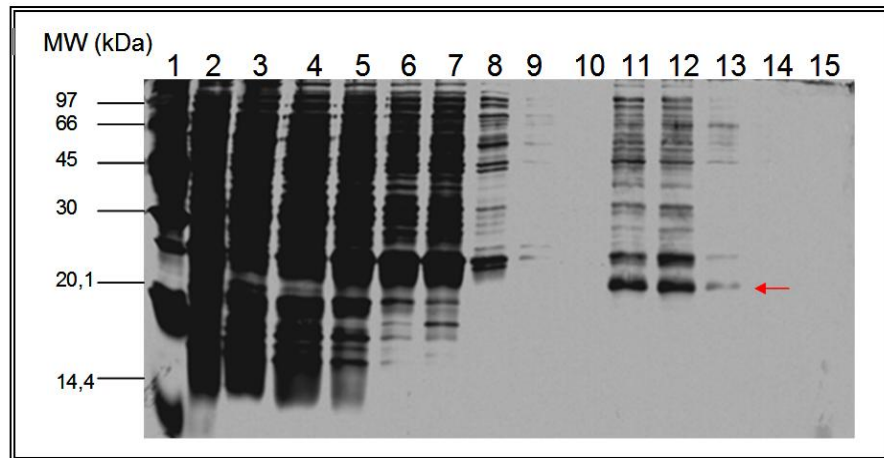


Figura 29. Etapas de purificação da proteína em coluna de Níquel-Sepharose – Eletroforese em gel de SDS-PAGE 15% corado com AgNO_3 . (1) Padrão de massa molecular com valores em kDa indicados ao lado; (2) *pellet* lisado (S1) antes da cromatografia, (3-10) as frações 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26 e 29 eluídas com 60 mM de Imidazol; (11-15) frações 38, 41, 44, 47 e 50 eluídas com 400 mM de Imidazol.

Ainda com a esperança de encontrarmos um melhor protocolo para expressão da proteína com a linhagem bacteriana BL21(DE3) tentamos também, dentre outras, as seguintes alternativas:

4.1.9 Alternativas para obtenção da molécula de interesse

4.1.9.1 Diferentes concentrações de IPTG

Busca por diferentes concentrações de IPTG variando de 0,1 mM a 10 mM que poderiam estar afetando no nível de expressão protéica (Sambrook et al., 1989).

A Figura 30 demonstra um exemplo de perfil obtido em SDS-PAGE da metodologia de expressão com 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM e 10 mM de IPTG, como podemos visualizar aparentemente uma banda menor que 13 kDa esperado foi visualizado nas concentrações de 0,5, 1 e 2 mM de IPTG. No entanto, quando realizamos *western blotting* utilizando anticorpo anti-*His-tag* não obtivemos visualização de banda revelada como o esperado (dados não mostrados).

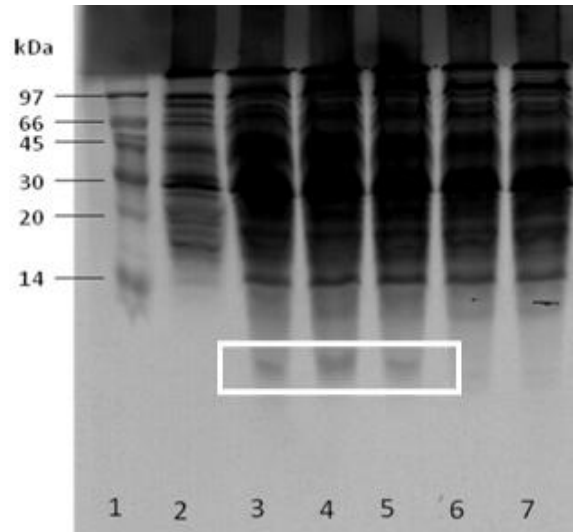


Figura 30. Expressão de H06A09_pAE em linhagem BL21(DE3) induzidos por 3 horas com diferentes concentrações de IPTG – Eletroforese em gel de SDS-PAGE 15% corado com Coomassie Blue: (1) Padrão de massa molecular com valores em kDa indicados ao lado; (2) *pellet* celular antes da indução por IPTG (T0); (3) *pellet* celular com 0,5 mM IPTG; (4) *pellet* celular com 1mM IPTG; (5) *pellet* celular com 2 mM IPTG; (6) *pellet* celular com 5 mM IPTG; (7) *pellet* celular com 10 mM IPTG.

4.1.9.2 Diferentes concentrações de glicose

Adição de 10 ou 20 mM de glicose ao meio de cultura, que por experiência em nosso Laboratório, ainda com esta linhagem bacteriana, tal componente foi capaz de melhorar a taxa de expressão de algumas proteínas (dados não publicados).

Como pode ser observado na Figura 31 não houve alteração significativa da expressão protéica com as concentrações de glicose adicionadas ao meio de cultura quando este foi induzido com 2 mM de IPTG durante 3 horas, a ausência de expressão foi também confirmada por *Western blotting* (dados não mostrados).

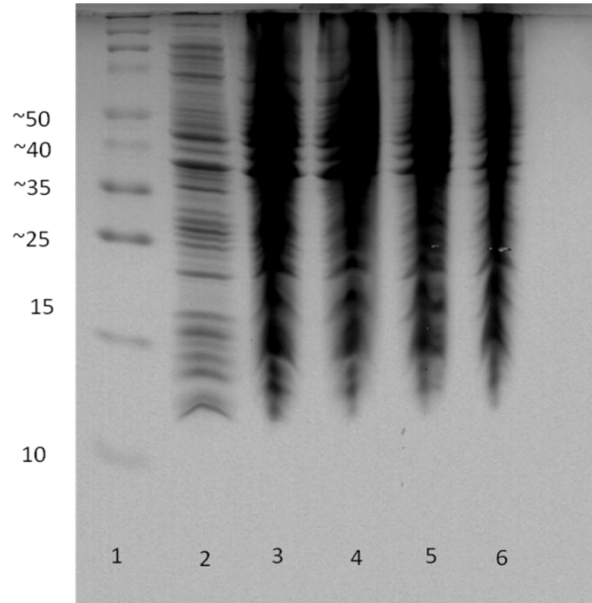


Figura 31. Expressão de H06A09_pAE em linhagem BL21(DE3) induzidos por 3 horas com 2 mM de IPTG em presença de glicose – Eletroforese em gel de SDS-PAGE 15% corado por Coomassie Blue: (1) padrão de massa molecular com valores indicados ao lado; (2) *pellet* celular antes da indução por IPTG (T0); (3 e 4) *pellet* celular com indução de 2 mM de IPTG; (5) *pellet* celular após indução 2 mM de IPTG e presença de 10 mM de glicose; (6) *pellet* celular após indução com 2 mM de IPTG em presença de 20 mM de glicose.

4.1.9.3 Diferentes períodos de indução

Como alternativa de busca de um protocolo ideal para obtenção da proteína de interesse foi também realizada a expressão em diferentes tempos de indução com 2 mM de IPTG. O perfil desta expressão nos tempos de indução 0,5; 1; 1,5; 2; 3 e 4 horas não está apresentado aqui. No entanto, foi verificado que a expressão em BL21(DE3) quando induzido por 2 mM de IPTG durante 3 horas, era possível visualizar uma banda de cerca de 13 kDa em SDS-PAGE o que mais uma vez nos encorajou a realizar a análise por *Western blotting*, tentativa essa mais uma vez infrutífera (dados não mostrados).

Como exemplificado acima foram feitas inúmeras tentativas de expressão em BL21(DE3) com diferentes protocolos que resultaram na não confirmação da expressão da proteína detectável pelo anticorpo anti-*His-Tag*, cabe ressaltar que todos os experimentos de *Western blotting* aqui realizados tinham como um controle positivo de expressão uma proteína expressa habitualmente por nosso grupo de pesquisa, denominada rLosac (Alvarez-Flores et al., 2006) que é expresso em grande quantidade em linhagem BL21(DE3) o qual sempre confirmou a eficiência do teste.

No entanto, para confirmar essa ausência de resultados positivos por *Western blotting* decidimos padronizar conforme os resultados obtidos por SDS-PAGE a expressão nesta linhagem de bactérias com 2 mM de IPTG e 3 horas de indução, já que eram os perfis que podíamos ao menos analisar a presença de uma banda do tamanho esperado. Assim, partimos para o protocolo de lise celular, utilizando para tanto, o protocolo por sonicação das células. Esse material, após lise celular, foi tratado para obtermos as frações presentes do corpúsculo de inclusão e material solúvel que, por sua vez, foram analisados tanto em SDS-PAGE, quanto por análise de atividade direta sobre plaquetas.

A figura 32 apresenta o perfil em SDS-PAGE de uma expressão do clone H06A09_pAE em BL21 (DE3) utilizando o protocolo de indução por 3 horas com 2 mM de IPTG, além das frações após lise celular e solubilização.

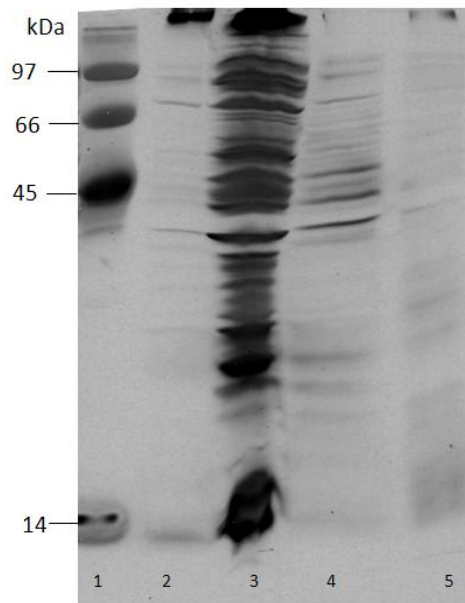


Figura 32. Diferentes etapas de expressão de proteínas após 3 horas de indução com 2 mM de IPTG em linhagem BL21(D3) – Eletroforese em gel de SDS-PAGE 12,5% corado com coomassie-blue: (1) padrão de massa molecular com valores indicados ao lado; (2) *pellet* da cultura antes da indução com IPTG (T0); (3) *pellet* com três horas de indução (T3); (4) *pellet* após lise celular por sonicação; (5) *pellet* solubilizado.

Intrigados com os resultados do não reconhecimento pelo anticorpo *Anti-His-Tag*, nos foi relatado por alguns pesquisadores do Instituto Butantan (Informação verbal) que algumas vezes, de maneira não muito comprovada, a expressão protéica pode estar acontecendo de uma forma que a molécula apresente uma

conformação tal que o anticorpo não a reconheça, apesar do fato de sabermos que em condições desnaturantes, próprias para o protocolo de eletroforese e *blotting*, a molécula esteja desenovelada o que facilitaria o reconhecimento, mesmo assim, decidimos supor que o protocolo de *western blotting* não estaria sendo eficiente no reconhecimento desta molécula e partimos para testar sua possível atividade sobre agregação plaquetária.

Para testar a atividade destas amostras fizemos um teste de agregação plaquetária em PRP (Plasma Rico em Plaquetas) utilizando colágeno (2 µg/mL) como agonista, já que o LAPP, proteína qual a molécula expressa apresenta similaridade é capaz de inibir (Connolly et al., 1992). Testamos tanto o material presente nos corpúsculos de inclusão após solubilização como o da fração solúvel após lise celular, no entanto, não obtivemos atividade da proteína em nenhuma das frações testadas e, portanto, não estamos apresentando este perfil gráfico de atividade.

Todas essas tentativas realizadas em *E. coli* BL21(DE3), foram as executadas já que esta linhagem é muito utilizada por nosso grupo por ser de fácil crescimento, de alto nível de expressão protéica e fácil indução. As cepas do tipo BL21(DE3) apresentam mutações nos genes que codificam as proteases OmpT e Lon que interferem no isolamento de proteases recombinantes intactas, incrementando assim a estabilidade protéica. As cepas DE3, em geral, apresentam no genoma uma cópia da T7 RNA Polimerase controlada pelo promotor lacUV5 (passível de ser induzida por IPTG) e que foi introduzida com ajuda do fago DE3. Assim, as DE3 são utilizadas para expressão de genes controlados pelo promotor T7.

4.1.9.4 Diferentes linhagens bacterianas

Assim, sentimos necessidade de testar outras estratégias, para tanto nos valem de mais dois sistemas de expressão utilizando as seguintes linhagens alternativas da bactéria *E. coli*: Origami (DE3) pLys; e Rosetta-Gami B (DE3).

A Origami (DE3) pLys (Novagen), por exemplo, é uma cepa de *E. coli* derivada de K-12 que possui mutações nos genes tioredoxina redutase (*trxB*) e glutathiona redutase (*gor*), o que torna o ambiente citoplasmático destas bactérias menos redutor e, portanto favorável à formação de pontes de dissulfeto (Eser et al., 2009), o que nos atraiu por sabermos que na estrutura da nossa proteína existem 6 cisteínas. Esta cepa também carrega uma mutação no gene *lacZY* o que permite o controle da expressão.

A cepa Rosetta-Gami B (Novagen) combina as características da BL21, Origami e Rosetta, aumentando a expressão de proteínas eucarióticas e a formação de pontes de dissulfeto no citoplasma bacteriano, assim as proteínas podem ser obtidas na fração solúvel (S1). Além dessas características esta cepa expressa seis tRNAs pouco usais que facilitam a expressão de genes que codificam códons raramente usados em *E. coli*, que poderia estar sendo o nosso problema na expressão em BL21(DE3).

A figura 33 apresenta um exemplo da expressão das diversas tentativas com as cepas citadas e esta figura em questão demonstra o perfil de expressão com 3 horas de indução com 2 mM de IPTG em linhagem Rosetta-Gami (DE3), este material também foi submetido à análise por *western blotting* onde mais uma vez não tivemos revelação de nenhuma banda nas frações estudadas. Tanto em linhagem Origami quanto Rosetta-Gami fizemos as mesmas tentativas de alteração de protocolo de expressão como os aqui demonstrados para BL21(DE3), onde eram variadas as concentrações do indutor de expressão (IPTG), em presença e ausência de glicose no meio de cultura e também com variações maiores no tempo de indução, variando de 3 a 72 horas de indução, já que para estas linhagens trabalhávamos em temperaturas mais amenas (20 °C) e seria esperado um crescimento celular mais lento e conseqüente expressão. A seguir estarão demonstrados alguns exemplos de perfis em SDS-PAGE obtidos com alguns protocolos, no entanto, para nossa infelicidade nenhum deles foi capaz expressar uma banda protéica reconhecível pelo anticorpo Anti-His-Tag, nem tampouco que

apresentasse atividade sobre plaquetas dentro dos protocolos estudados, o que dificultou o trabalho, e nos desanimou nos estudos com expressão em sistema procarioto.

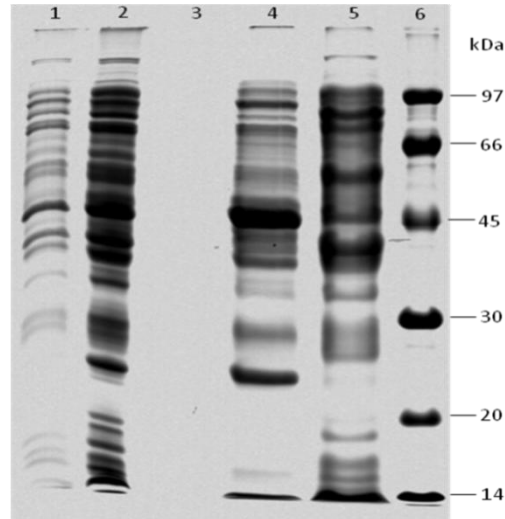


Figura 33. Diferentes etapas de expressão de proteínas em linhagem Rosetta-Gami – Eletroforese me gel de SDS-PAGE 15% corado com coomassie-blue: (1) *pellet* celular antes da indução com IPTG (T0); (2) *pellet* após 3 horas de indução (T3); (3) sobrenadante após 3 horas de indução; (4) fração solúvel; (5) fração solubilizada a partir do corpúsculo de inclusão; (6) padrão de massa molecular com valores indicados ao lado.

Apesar destes problemas encontrados aqui com a expressão em sistema procarioto, em especial em *E.coli*, cabe mencionar que insistimos no mesmo já que além de ser habitual a utilização destes protocolos sempre apresentaram boas taxas de expressão de diversas moléculas estudadas por nosso grupo (rAmblyomin (Batista et al., 2010), rLosac (Alvarez-Flores et al., 2006), rLopap (Reis et al., 2006), além do que, este sistema seria uma alternativa que proporcionaria baixos custos, especialmente no caso de um possível futuro escalonamento (Yin et al., 2007).

Contudo todas as alternativas utilizadas para a obtenção da molécula recombinante em *E.coli* foram inconclusivas, e apesar de em alguns protocolos visualizarmos em SDS-PAGE bandas do tamanho esperado, os ensaios em *western blotting* e atividade sobre plaquetas nunca foram positivos, porém, ainda restava a dúvida de que talvez a proteína estivesse sendo expressa em conformação tal que dificultasse sua confirmação, ou ainda, que sua atividade fosse diferente da esperada. Assim, optamos pela alteração da estratégia para obtenção da molécula e partimos em busca de uma nova clonagem para expressão em organismos eucariotos (*Pichia pastoris*).

4.2 Sistema Eucarioto – Clonagem e expressão

4.2.1 Clonagem do transcrito H06A09 em pPIC9K

Após análise do mapa de restrição do H06A09 e mapa do vetor pPIC9K iniciamos o processo de clonagem por reações de PCR com oligonucleotídeos específicos e desenhados com sítios de restrição direcionados para a clonagem. Na figura 34 temos o resultado da reação de PCR realizada com os oligonucleotídeos específicos em gel de agarose 1%, onde podemos visualizar as bandas de aproximadamente 500 pares de bases, correspondente ao clone H06A09, a banda correspondente ao inserto foi recortada do gel, eluída e purificada.

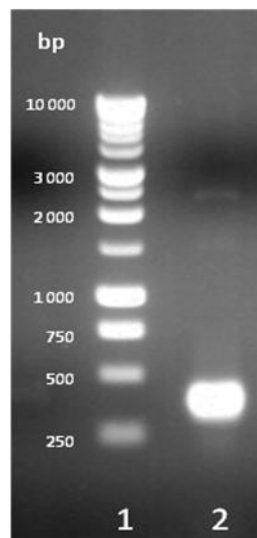


Figura 34. PCR dos clones eleitos - Eletroforese em gel de Agarose 1% corado com Brometo de Etídio. (1) Padrão de massa molecular 1kb DNA Ladder (Promega) com valores indicados na figura; (2) PCR do clone H06A09.

4.2.2 Digestão Enzimática do Inserto H06A09 e do vetor pPIC9K

Após a obtenção do produto de PCR purificado do gel de agarose, deu-se início aos processos de digestão enzimática tanto dos produtos de PCR, quanto do plasmídeo pPIC9K.

As enzimas *NotI* e *EcoRI* foram utilizadas para realizar a digestão tanto do produto de PCR quanto do vetor pPIC9K. A figura 35 indica essa segunda etapa da digestão enzimática de inserto e vetor.

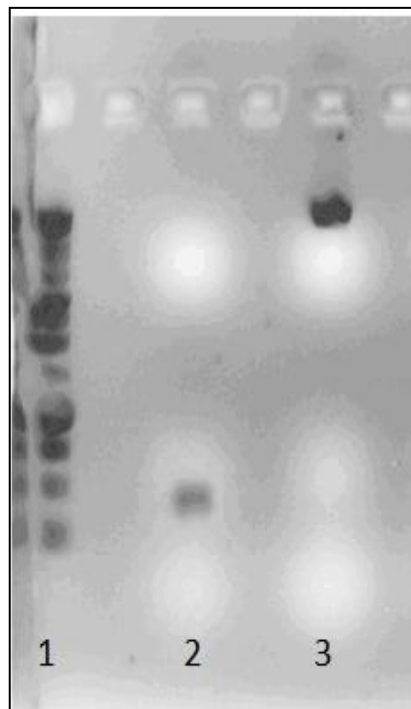


Figura 35. Digestão do produto de PCR do clone H06A09 e do vetor pPIC9K - Gel de Agarose 1% corado com Brometo de Etídio. (1) Padrão de massa molecular (250, 500 (altura da banda de interesse), 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000 e 10000 pares de bases); (2) Digestão do produto de PCR do inserto H06A09 com as enzimas *NotI* e *EcoRI*; (3) Digestão do vetor pPIC9K com as enzimas *NotI* e *EcoRI*.

4.2.3 Ligação do inserto ao vetor pPIC9K

Após eluição das bandas da digestão do gel o produto foi ligado por cerca de 20 horas e utilizado para transformação em bactérias competentes DH5 α para obtenção de uma maior quantidade do plasmídeo. Após o crescimento das colônias, e certificação por PCR de colônia selecionamos aquela que melhor reproduziu o PCR, obteve-se maior quantidade do plasmídeo recombinante H06A09_pPIC9K,

seguido da linearização e transformação de *Pichia pastoris*, linhagem GS115 por eletroporação.

As placas MD com as colônias positivas para a transformação de *P. pastoris* tiveram suas colônias certificadas por PCR, como indicado na figura 36.

É possível visualizar que das 14 colônias selecionadas para a reação de PCR com os primers Aox, apenas duas não apresentavam o inserto esperado. Destas, selecionamos as cinco primeiras para fazer uma expressão em pequena escala e ver qual expressaria melhor a proteína de interesse. E podemos observar que a primeira teve uma banda com um pouco mais de definição.

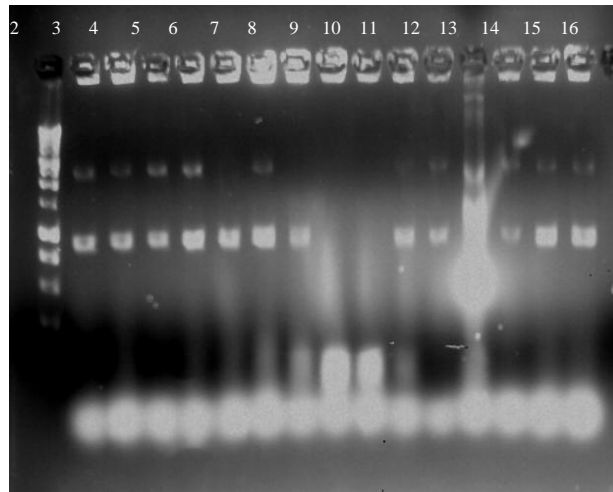


Figura 36. PCR de colônia transformadas por eletroporação com plasmídeo H06A09_pPIC9K em *Pichia pastoris*, linhagem GS115 – Eletroforese em gel de Agarose 1% corado com Brometo de Etídio. (1) Padrão de massa molecular (250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000 e 10000 pares de bases); (2-16) PCR das diversas colônias.

4.2.4 Expressão do vetor H06A09_pPIC9K em *Pichia pastoris* linhagem GS115

Antes de iniciar a produção de proteína de interesse no sistema heterólogo, foi feita uma otimização das condições de expressão como meio de cultura, tempo de expressão, concentração do indutor metanol, concentração celular entre outros fatores, pois além da obtenção de altas concentrações de proteínas para o estudo, a redução do custo de produção do inibidor através de otimização é uma etapa fundamental para uma futura aplicação do produto.

As primeiras condições a serem determinadas foram o melhor tempo de expressão e os dois diferentes meios de cultura BMGY e BMG, que se trata de meios com diferentes concentrações e qualidades de nutrientes para o organismo em questão, sendo o BMGY um meio mais completo e o BMG um meio mais escasso, porém que promove a obtenção de um sobrenadante mais limpo de contaminantes.

A figura 37 demonstra o perfil em SDS-PAGE da expressão de uma colônia eleita, em meios BMGY e BMG, em diferentes tempos de indução por Metanol, comparadas com o controle negativo de expressão de uma colônia de GS115 transformada com um vetor pPIC9K vazio (sem presença do inserto H06A09). Podemos perceber que aparentemente a expressão em meio BMGY mostrou-se mais eficiente e apresenta a expressão de bandas não expressas pelo plasmídeo vazio (controle negativo).

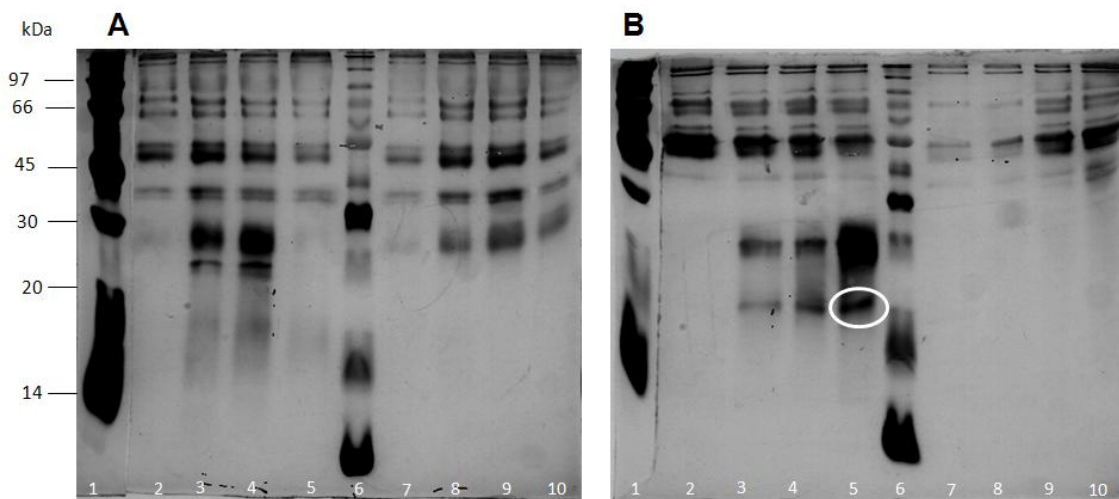


Figura 37: Diferentes tempos de expressão com dois meios de cultura diferentes de uma colônia pPIC9K_H06A09 em *P. pastoris* GS115 comparado a expressão do pPIC9K vazio (controle negativo) - Eletroforese em gel de SDS-PAGE 15% corado com AgNO_3 :
Painel A: Expressão em meio de cultura BMG (1) padrão de massa molecular com valores indicados na figura; (2) expressão da colônia 1 no tempo de indução 0 h; (3) expressão da colônia 1 no tempo de indução 24 h; (4) expressão da colônia 1 no tempo de indução 48 h; (5) expressão da colônia 1 no tempo de indução 72 h; (6) marcador de massa molecular; (7, 8, 9 e 10) expressões de colônia controle negativo transformada com o pPIC9K vazio nas horas 0, 24, 48 e 72 h, respectivamente.
Painel B: Expressão em meio de cultura BMGY (1) padrão de massa molecular com valores indicados na figura; (2) expressão da colônia 1 no tempo de indução 0 h; (3) expressão da colônia 1 no tempo de indução 24 h; (4) expressão da colônia 1 no tempo de indução 48 h; (5) expressão da colônia 1 no tempo de indução 72 h; (6) marcador de massa molecular; (7, 8, 9 e 10) expressões de colônia controle negativo transformada com o pPIC9K vazio nas horas 0, 24, 48 e 72 h, respectivamente.

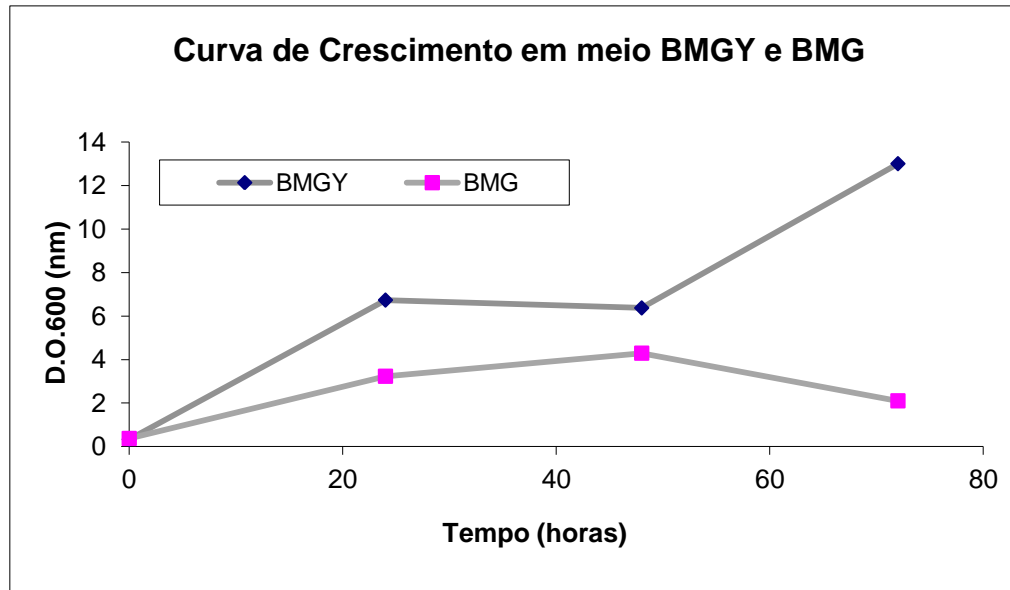


Figura 38. Curva de crescimento durante o período de expressão protéica com meio BMG e BMGY.

Apesar destas bandas não apresentarem a massa molecular esperada, consideramos que sistemas de expressão em organismos eucariontes são capazes de promover a glicosilação de proteínas, e neste caso, existe a possibilidade de que a nossa molécula esteja sendo glicosilada, já que possui um sítio para N-glicosilação. O provável sítio de glicosilação foi estimado através do programa Prosite (Hulo et al., 2006) e está apresentado na figura 39.

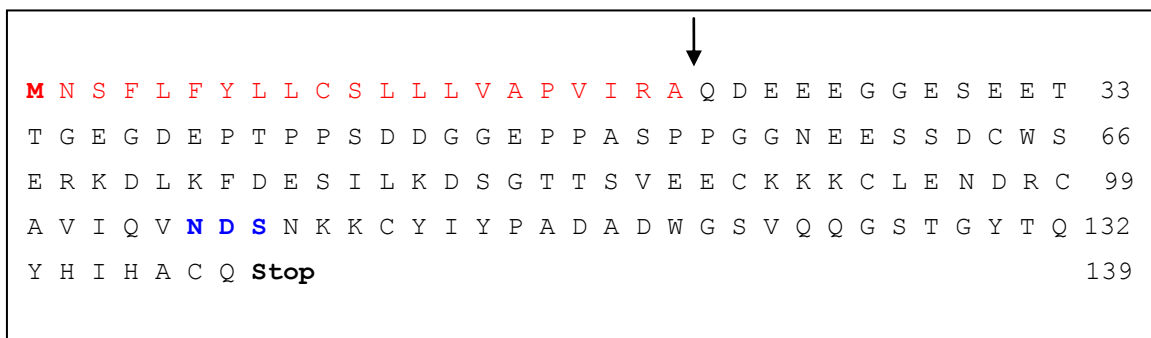


Figura 39. Seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA de H06A09. O peptídeo sinal predito está indicado em vermelho e o sítio de glicosilação está indicado em azul. A seta indica o sítio de processamento do peptídeo sinal. Os números à direita indicam o total de aminoácidos apresentados em cada linha.

Sabe-se que proteínas recombinantes podem apresentar diferentes padrões de glicosilação com cadeias oligossacarídicas de diversos tamanhos, constituídas principalmente por resíduos de manose (Macauley-Patrick et al., 2005). Isto pode resultar na alteração da massa molecular da proteína, observando-se, em muitos

casos, diferentes bandas protéicas no perfil eletroforético (Porres et al., 2002). Discutiremos posteriormente o tratamento da amostra com a enzima deglicosilase endo H.

Como no caso de expressão em vetor pPIC9K não apresentarmos a fusão com uma cauda de histidina e não possuímos nenhum anticorpo que reconheça a proteína sendo expressa neste sistema, não tivemos a possibilidade de avaliar pela metodologia de *western blotting*. Logo, ao analisarmos a Figura 36 verificamos que o sobrenadante celular da cultura em meio BMGY após 72 horas de expressão se mostrou mais eficiente, assim, partimos deste material para busca do melhor critério de purificação.

Durante a otimização da expressão, a concentração de metanol e a densidade celular também foram avaliados. A utilização de altas concentrações de metanol em uma cultura de baixa densidade celular pode levar a um efeito tóxico para as células, prejudicando assim, o bom rendimento da expressão, e até a própria estabilidade da proteína. Por outro lado, o emprego de baixas concentrações de metanol em uma cultura de alta densidade celular pode não ser suficiente para promover a expressão significativa da proteína de interesse; conseqüentemente, a concentração ótima de metanol para expressão em diferentes densidades celulares e para cada proteína expressa, necessita ser avaliada (Damaso et al., 2004). Verificamos em nossos ensaios que a concentração de indutor mais eficiente para expressão protéica era de 0,5% de metanol. Variantes de temperatura e agitação também foram buscadas e concluímos que a melhor condição para expressão da proteína era indução com 0,5% de metanol, agitação a 260 rpm, a 28 °C em meio BMGY.

4.3 Estratégias para purificação da proteína expressa

Traçamos diversos caminhos para obtenção do isolamento da proteína recombinante estudada no presente trabalho. O fluxograma das estratégias adotadas para a purificação pode ser visualizado na figura 40.

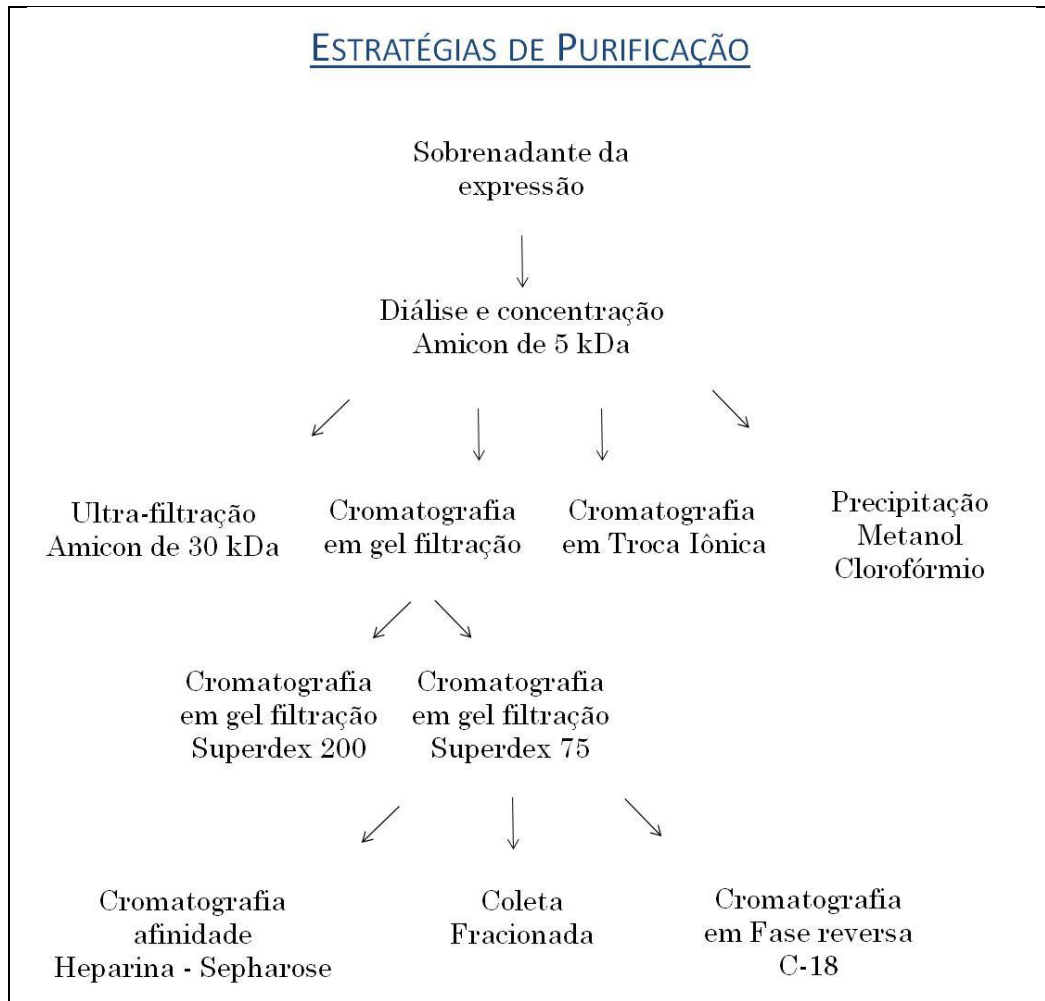


Figura 40. Estratégias de purificação adotadas para proteína expressão em Sistema *Pichia pastoris*.

4.3.1 Concentração e Diálise

O passo inicial para purificação da amostra proveniente do sobrenadante celular expresso em 72 horas de expressão com 0,5% de metanol em meio BMGY, a 28 °C e sob agitação de 260 rpm foi a concentração e diálise em membranas de ultrafiltração tangencial Amicon 5 kDa (Millipore).

A partir deste uma nova filtração foi testada realizada em ultra-filtro com corte de 30 kDa, onde era esperado obter a separação do material de acordo com a massa molecular da membrana, eliminando contaminantes maiores que 30 kDa.

Era esperado que a proteína permanecesse no material retido na membrana de 5 kDa e no material não retido pela membrana de 30 kDa, já que por SDS-PAGE a proteína estimada apresenta cerca de 20 kDa. Como podemos visualizar na figura

41, houve retenção da proteína de interesse na membrana de 30 kDa, concluímos que este não seria um bom método para darmos continuidade.

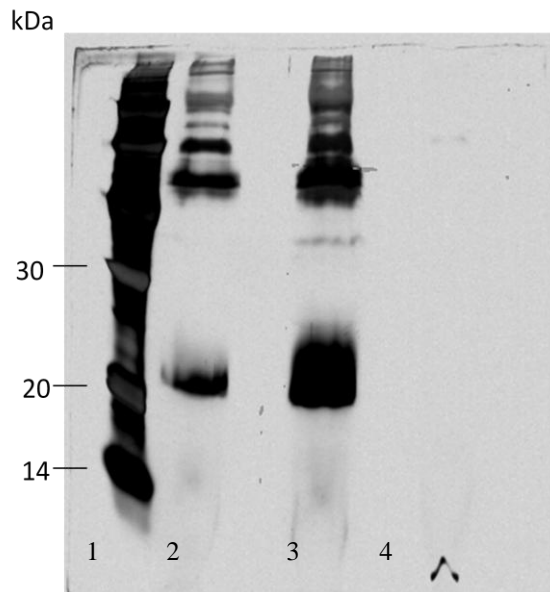


Figura 41. Etapas de purificação por Ultra-filtração - Eletroforese em gel de SDS-PAGE 12,5% corado por prata: . (1) Padrão de massa molecular (97, 66, 45, 30, 20 1 14 kDa); (2) sobrenadante da expressão; (3) material retido pela membrana Ultra-filtração de 30 kDa; (4) material eluído pela membrana de 30 kDa.

No decorrer do desenvolvimento deste trabalho percebemos que o processo de ultrafiltração era uma metodologia que gerava um custo alto na aquisição das sensíveis membranas, além do tempo de centrifugações, sendo assim decidimos testar também o processo de liofilização para otimizar o tempo e diminuir os gastos. Para verificar se esta metodologia, além de eficiente, não alterava a atividade da molécula, testes de agregação plaquetária foram realizados com as amostras que foram submetidas ou não, a esta metodologia e verificamos que se tratava de uma metodologia viável e a mesma foi empregada no decorrer do trabalho em substituição da ultrafiltração tangencial em Amicon 5 kDa (dados não mostrados).

4.3.2 Precipitação com Sulfato de Amônio – salting out

A precipitação com sulfato de amônio faz a separação de proteínas através da conversão de seu estado solúvel para o insolúvel através da adição de solução salina saturada. Este ensaio foi realizado por ter a capacidade de separar proteínas

de acordo com a concentração de sal do meio, além de ser um método barato e simples para início do processo de purificação. Caso tivéssemos um resultado no qual grande parte das demais proteínas presentes na amostra fosse precipitada e assim separada da proteína de interesse prosseguiríamos a partir deste passo.

Inicialmente realizamos precipitações com apenas 5% de saturação com e sem agitação, com controles negativos, onde amostras foram submetidas às mesmas condições (agitação e temperatura); porém como pode ser observada na figura 42, nenhuma diferença pode ser notada no perfil protéico, indicando, inclusive, que as condições de agitação e incubação em câmara fria não alteravam o perfil da proteína de interesse quando comparada com a amostra mantida a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

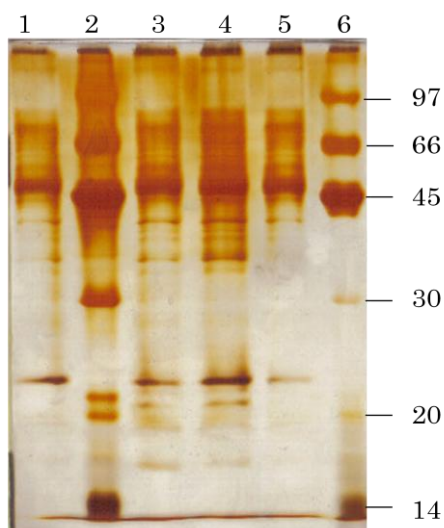


Figura 42. Precipitadas com sulfato de Amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - Eletroforese em gel de SDS-PAGE 12,5% corado por prata : (1) Sobrenadante da Expressão mantido a -20°C ; (2) Padrão de massa molecular; (3) Sobrenadante da Expressão mantido a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; (4) Sobrenadante da Expressão submetido à *Salting out* com agitação a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; (5) Sobrenadante da Expressão submetido à *salting out* sem agitação a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$; (6) Padrão de massa molecular com valores indicado na figura.

Após a confirmação de que as condições em que a precipitação é realizada aparentemente não alteram/degradam a banda de interesse, o passo seguinte foi a realizar a precipitação com diferentes concentrações de saturação.

Foi testado dois diferentes protocolos, onde a precipitação foi realizada *overnight* com e sem agitação na câmara fria. Na figura 43 podemos observar o resultado das precipitações feito com concentrações que variaram de 5 a 50% de saturação, incubados sem agitação (A) e com agitação (B). Onde não pudemos observar diferenças no padrão protéico da amostra que considerássemos

importantes num processo de purificação, o que nos levou a concluir que este método não seria utilizado para padronização da purificação da proteína de interesse.

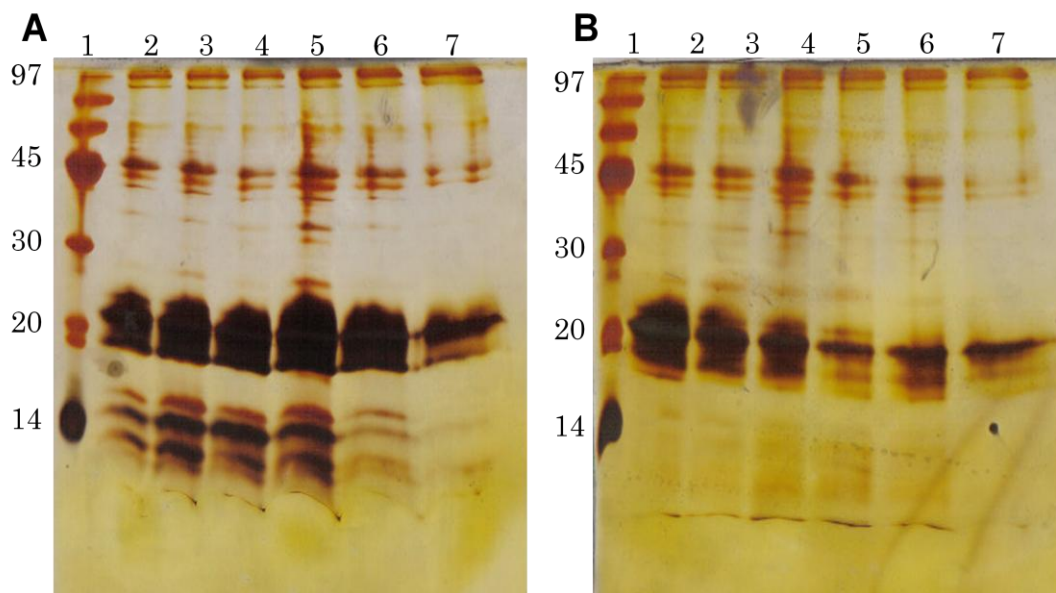


Figura 43. Precipitação do sobrenadante da expressão com sulfato de Amônia ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) em diferentes concentrações com e sem agitação – Eletroforese em gel de SDS-PAGE 15% corado com AgNO_3 : **A:** Precipitação com sulfato de Amônia Sem Agitação (1) padrão de massa molecular com valores indicados na figura; (2) expressão precipitada com 5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (3) expressão precipitada com 10% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (4) expressão precipitada com 20% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (5) expressão precipitada com 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (6) expressão precipitada com 40% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (7) expressão precipitada com 50% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. **B:** Precipitação com sulfato de Amônia Com Agitação (1) padrão de massa molecular com valores indicados na figura; (2) expressão precipitada com 5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (3) expressão precipitada com 10% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (4) expressão precipitada com 20% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (5) expressão precipitada com 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (6) expressão precipitada com 40% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (7) expressão precipitada com 50% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

4.3.3 Cromatografia de Troca iônica – Mono Q

A próxima estratégia utilizada foi a tentativa da purificação por Troca-Iônica. Para tanto escolhemos a resina Mono-Q, no qual a amostra aplicada foi o material concentrado em Amicon (5 kDa).

Como é possível visualizarmos bandas expressas no plasmídeo recombinante que não estão presentes no perfil de SDS-PAGE do plasmídeo vazio, decidimos realizar a cromatografia de troca iônica também de forma comparativa com a purificação da expressão do material proveniente do plasmídeo vazio. Quando

observamos o perfil em A280 do processo cromatográfico demonstrado na Figura 44, verificamos que por volta de 800 mM de NaCl existe um pico protéico (pico IX) que está sendo eluído do material proveniente da expressão do vetor H06A09_pPIC9K (B) que não aparece na purificação da expressão do pPIC9K vazio (A). Os picos protéicos de ambas as corridas forma analisados por eletroferese em gel de SDS-PAGE foi observado que, infelizmente esta não foi uma metodologia eficiente e que o pico diferenciado não condizia com a proteína recombinante esperada, tratando-se provavelmente de um artefato.

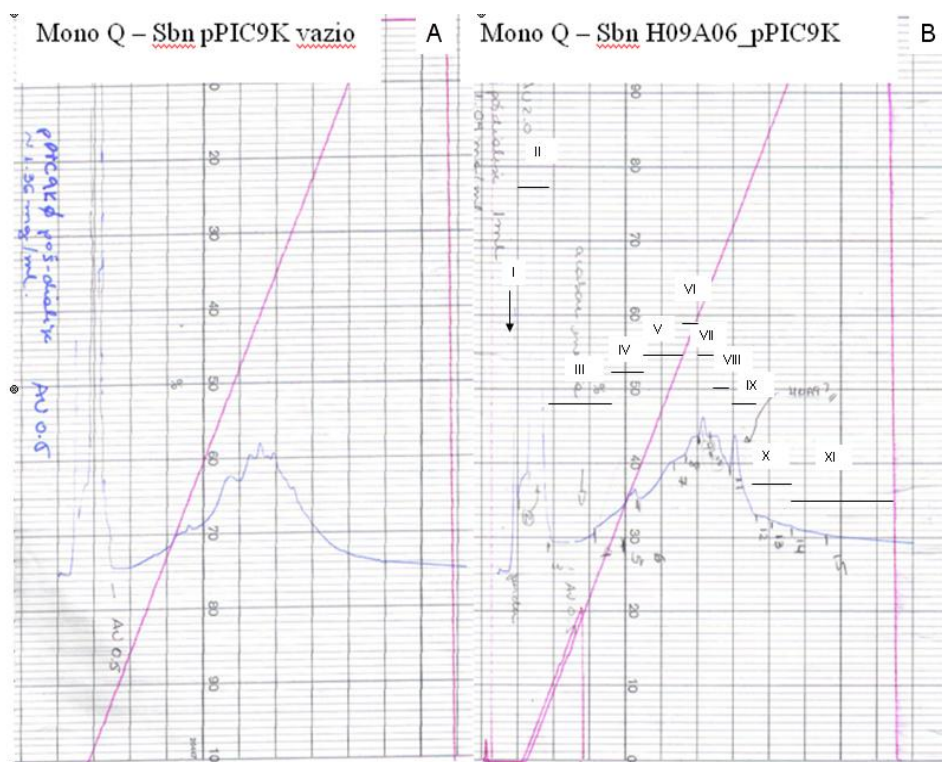


Figura 44. Troca Iônica – Mono Q - Perfis Cromatográficos utilizando sobrenadantes das expressões com pPIC9K_vazio (A) e pPIC9K_H06A09 (B). Em A temos 1,36 mg de proteína total do sobrenadante da cultura de pPIC9K vazio após 72 horas de indução com Metanol pós diálise; Em B temos 1,09 mg de proteína do sobrenadante da cultura de H06A09_pPIC9K após 72 horas de indução com Metanol pós diálise. A cromatografia foi realizada a temperatura ambiente, sendo as frações incubadas em gelo após a coleta, gradiente linear de 0 a 100 % de tampão B com fluxo de 0,5 mL/min.

4.3.4 Cromatografia em Gel filtração – Superdex 200

Apesar de conhecidamente saber que a gel filtração não é um processo rotineiramente utilizado para dar início a estratégias de purificação protéica, analisando o perfil eletroforético das bandas protéicas do material expresso, dialisado e concentrado em Amicon (Figura 41) consideramos que seria uma alternativa viável já que existiam bandas localizadas principalmente acima dos 45 kDa e a banda do nosso interesse próxima a 20kDa, assim, a primeira alternativa de Gel Filtração que utilizamos foi a resina Superdex 200 (GE Healthcare) em sistema FPLC, no entanto, o perfil de eluição em A280 não mostrou-se satisfatório, já que não conseguimos separar picos protéicos definidos por esta estratégia, como pode ser visualizado na figura 45. As frações protéicas foram analisadas por SDS-PAGE, nos certificando não ser este um bom processo para dar início a purificação, já que conforme pudemos notar (dados não mostrados) houve um arraste de proteínas de diferentes massas moleculares prejudicando o processo.

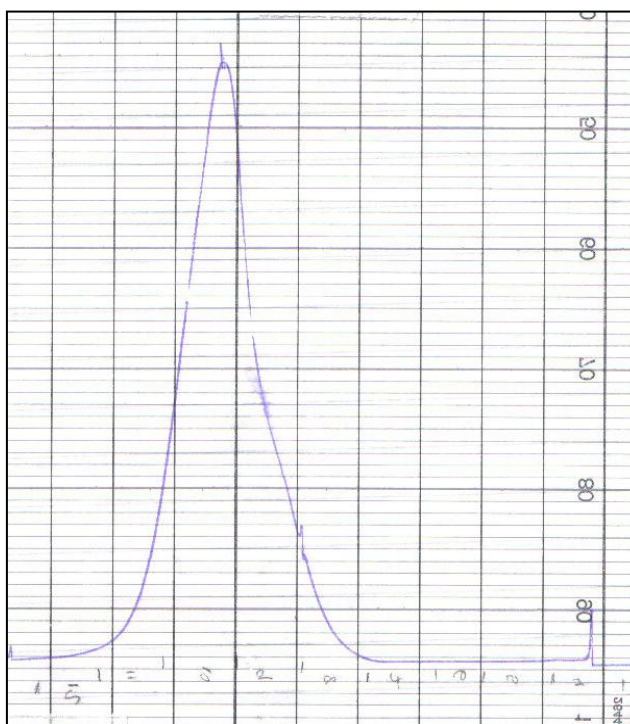


Figura 45. Gel filtração em Superdex 200 - Perfil Cromatográfico: Amostra aplicada 200 μ g do sobrenadante da cultura de pPIC9K_H06A09 após 72 horas de indução com Metanol pós diálise em tampão de eluição. A coleta foi realizada a temperatura ambiente, seguido de incubação em gelo, fluxo de 0,5 mL/min do tampão de eluição.

4.3.5 Cromatografia em Gel filtração – Superdex 75 – (Estratégia de coleta 1)

Uma outra alternativa para a busca de um método para purificação da proteína de interesse foi novamente a cromatografia em gel filtração, desta vez em resina Superdex 75, sistema FPLC. A amostra aplicada era proveniente do material dialisado e concentrado em Amicon. (5 kDa). O perfil cromatográfico da corrida aparentemente era desanimador por não apresentar definição de vários picos protéicos (Figura 46), como está demonstrada na figura, a coleta das frações foi realizada por uma estratégia na qual todo principal pico protéico (fração 3) foi coletado de uma só vez, após a análise por perfil eletroforético (figura 47), concluímos que este seria uma alternativa válida a ser utilizada para purificação da proteína de interesse.

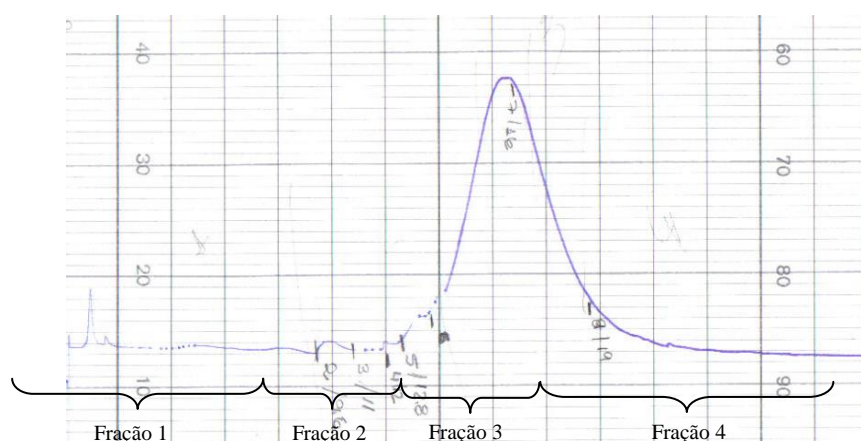


Figura 46. Gel filtração Superdex 75 - Perfil Cromatográfico - *Estratégia 1 de coleta dos picos* – Amostra aplicada 200 µg do sobrenadante da cultura de pPIC9K_H06A09 após 72 horas de indução com Metanol, concentração em Ultra-Amicon de 5 kDa e diálise em tampão de eluição. A coleta foi realizada a temperatura ambiente, seguido de incubação em gelo, fluxo de 0,5 mL/min do tampão de eluição com duração de 60 minutos.

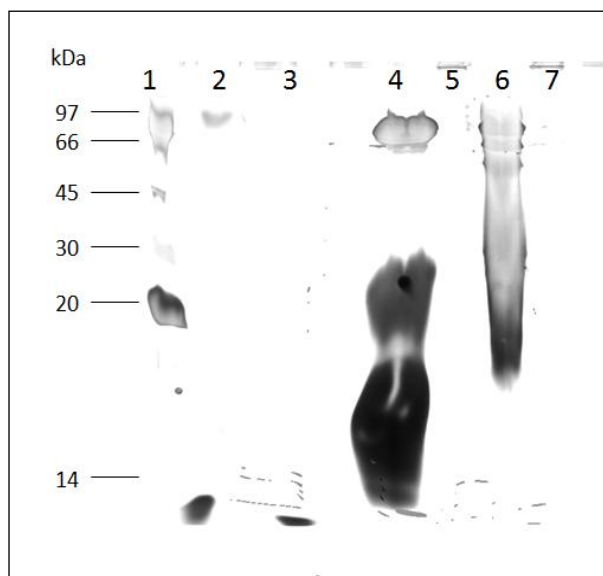


Figura 47. Perfil das frações coletados da cromatografia em gel filtração – Superdex 75 - Eletroforese em gel de SDS-PAGE 12,5% corado com prata: (1) Padrão de massa molecular com valores indicados na figura; (2) fração 1 coletado; (3) fração 2 coletado; (4) fração 3 coletado; (5) fração 4 coletado.

No decorrer da busca pelo melhor processo de purificação da proteína recombinante, foram realizado testes para comprovação da atividade da mesma em agregação plaquetária. Após a cromatografia em Superdex 75 testamos as amostras utilizando inicialmente apenas o sangue total e como agonista, o colágeno.

A figura 48 apresenta os resultados deste teste tendo sido as amostras incubadas em dois tempos com duas concentrações diferentes da proteína semi-purificada referente a fração 3 representado na figura 46. Podemos visualizar que nos dois tempos de incubação houve uma inibição de cerca de 20-25% quando utilizamos 30 μg de amostra comparados ao controle (salina); porém quando utilizamos 15 μg da amostra a inibição foi pouco notada.

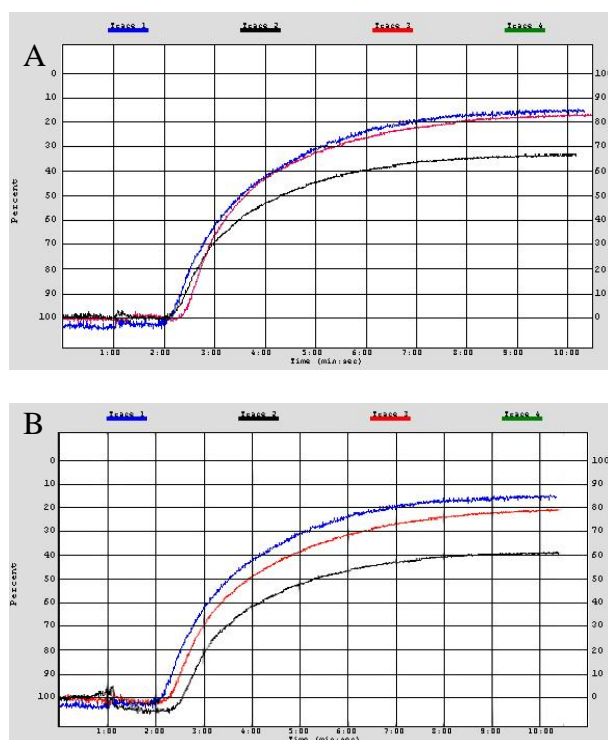


Figura 48. Teste de inibição de agregação plaquetária com a proteína recombinante semi-purificada em sangue total induzida por Colágeno. Em **A** o controle (azul), 15 μ g da proteína (vermelho) e 30 μ g da proteína (preto), incubados a 37 °C por 10 minutos. Em **B** o controle (azul), 15 μ g da proteína (vermelho) e 30 μ g da proteína (preto), incubados a 37 °C por 30 minutos.

Este teste, apesar de preliminar nos confirmou estarmos trabalhando com a proteína recombinante de interesse já que a mesma apresentou atividade inibitória de agregação plaquetária, que apesar de baixa era esperada. Assim, continuamos a busca pela metodologia mais apropriada de purificação.

4.3.6 Cromatografia em fase Reversa – C-18

Keller et al. (1992) quando trabalharam com a proteína nativa - LAPP e com a proteína recombinante - rLAPP obtiveram sucesso na purificação concentrando-as em ultrafiltração tangencial com poro de 10 kDa seguindo por cromatografia de afinidade em coluna heparina-agarose, gel filtração em coluna Superose 12 (FPLC), microconcentração entre 10 kDa e 30 kDa e cromatografia em fase reversa (C18)

em sistema FPLC e assim manteve a atividade inibitória da molécula sobre plaquetas. Assim, optamos por submeter a amostra proveniente da gel filtração em Superdex 75 a uma fase reversa em resina C18.

Logo, a fração 3 proveniente da cromatografia em Superdex 75 foi dialisada, concentrada e submetida a cromatografia em resina C18 em sistema FPLC, como visualizado na figura 49. O processo cromatográfico foi constituído de 5 minutos em tampão A (0,1% TFA), de 5 a 25 minutos gradiente de 0 a 100% de tampão B (90 % Acetonitrila e 0,1% TFA), e de 25 a 27 minutos em tampão B, e de 27 a 30 minutos gradiente de B diminuindo de 100 para 0%, e de 30 a 40 minutos apenas tampão A.

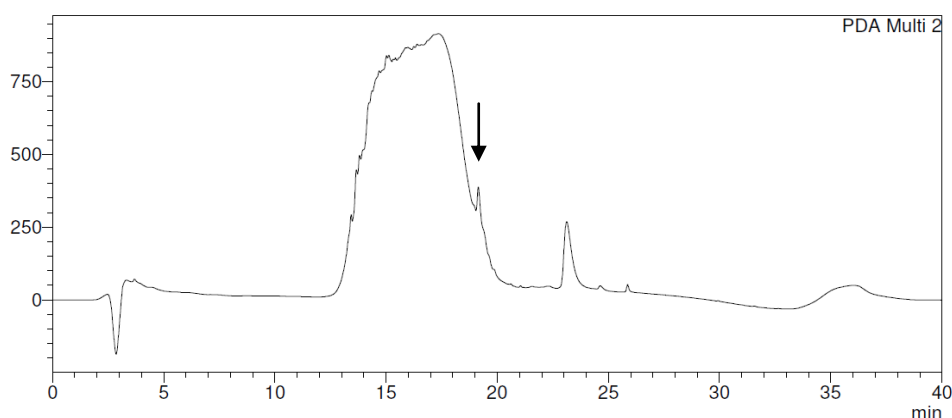


Figura 49. Fase reversa (C-18) – Perfil cromatográfico do material proveniente da cromatografia em Superdex 75 - fração 3 (300 µg). A seta indica o pico da proteína de interesse, que é eluído á uma concentração 70% do tampão B (90 % Acetonitrila e 0,1% TFA). A coleta foi realizada em gelo, fluxo de 1 mL/min com duração de 40 minutos.

Os picos coletados na corrida em C18 foram concentrados e o perfil da cromatografia submetido à SDS-PAGE 12,5% e pode ser visualizado na figura 50. Podemos observar uma banda aparentemente pura sendo eluída com 70% do gradiente com tampão B (90% de Acetonitrila e 0,1% TFA) referente ao pico em destaque na figura 49.

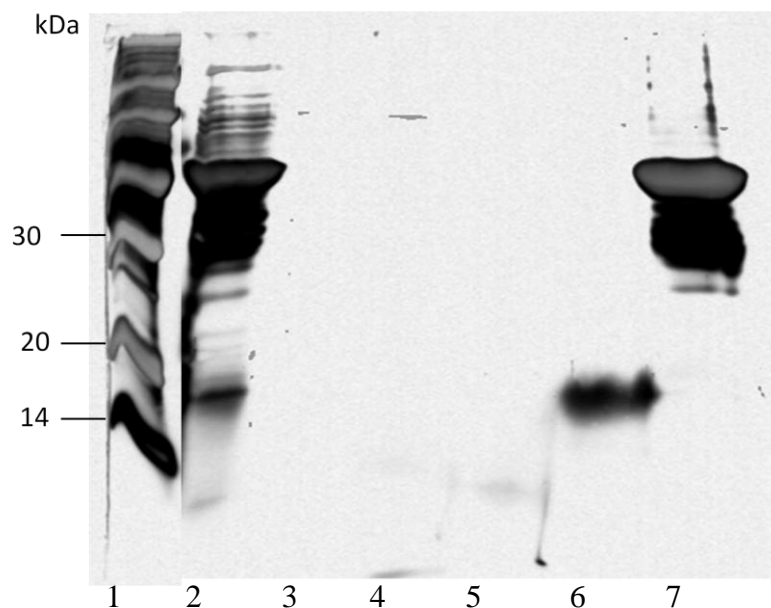


Figura 50. Perfil de frações coletadas da cromatografia em fase reversa - Eletroforese em gel de SDS-PAGE 12,5% corado com AgNO_3 : (1) Padrão de massa molecular com valores indicados na figura; (2) material de entrada na C18 (fração 3da Superdex 75); (3) frações coletadas de 12,5 a 15 minutos; (4) frações coletadas de 15 a 17,5 minutos; (5) frações coletadas de 17,5 minutos ao fim do pico (6) pico coletado aos 19 minutos; (7) pico coletado de 23 a 24 minutos.

Esta técnica se mostrou muito eficiente para a purificação da banda protéica que esperávamos, assim, o próximo passo foi confirmar se esta técnica seria eficiente através do teste de inibição de agregação plaquetária com a amostra.

Desta vez os testes foram realizados utilizando plasma rico em plaquetas (PRP) com o agonista Colágeno, e seu resultado está apresentado na figura 51. Se observarmos a figura podemos notar que 30 μg da amostra proveniente da cromatografia em gel filtração (representado na cor preta) apresentou, diferentemente de quando testada em sangue total (Figura 48), uma inibição significativa de cerca de 45% quando comparado ao controle; por outro lado, o material submetido à fase reversa em C18, referente a banda de massa molecular aparentemente pura, não apresentou alteração no teste de agregação plaquetaria. Neste ensaio as amostras (30 μg) foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos antes da indução de agregação pelo colágeno.

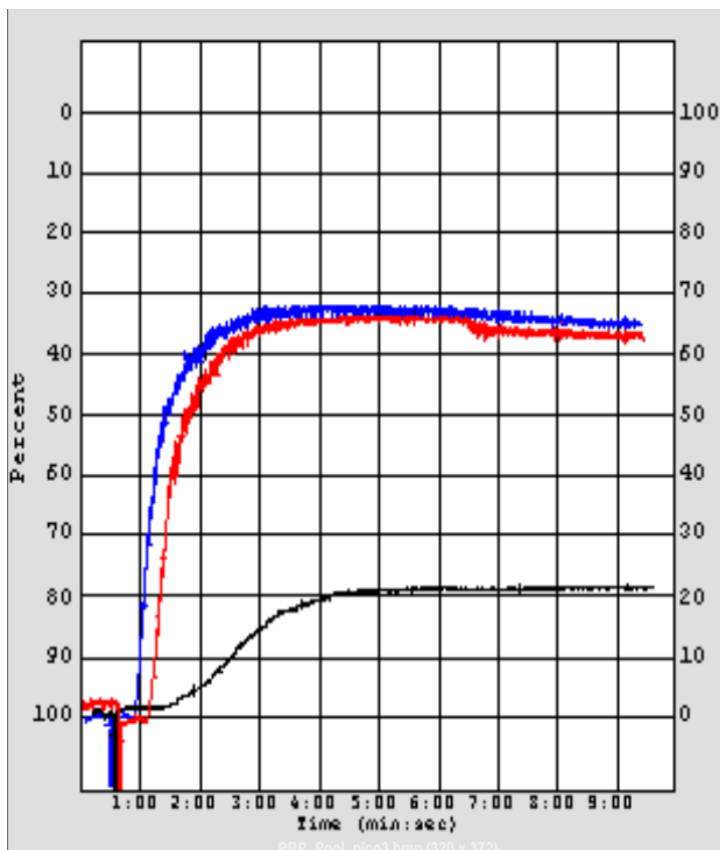


Figura 51. Atividade da proteína em duas fases de purificação sobre a agregação plaquetária – Teste realizado com PRP induzida por colágeno. Em Azul temos o controle realizado com salina, em preto teste realizado com 30 µg do fração 3 da cromatografia em gel filtração e em vermelho o teste realizado com 30 µg do material purificado da fase reversa C18.

O processo de purificação em fase reversa que utiliza Acetonitrila e TFA na composição do tampão eluente, em geral, é uma técnica em que muitas proteínas perdem sua atividade, devido ao baixo valor do pH proporcionado pelas Acetonitrila e TFA e a alta pressão da cromatografia. Assim, fomos em busca de um outro método de purificação que fosse menos agressivo para a manutenção da atividade da proteína em questão.

Por outro lado, o material proveniente da cromatografia em fase reversa foi submetido a seqüenciamento para confirmação do N-terminal, estes resultados estarão descritos a seguir.

4.3.7 Cromatografia em Gel filtração – Superdex 75 – (Estratégia de coleta 2)

Outra estratégia foi testar algumas formas de coleta do pico principal (fração 3) da cromatografia de Gel filtração em Superdex 75 (Figura 52) já que tratava-se de um perfil em forma de “morro” o que caracteriza a presença de mais de uma proteína sendo eluída em tempos próximos, assim, alteramos para uma coleta diferenciada da subida, do topo e da descida do pico, denominando-os de frações 3A, 3B e 3C, respectivamente.

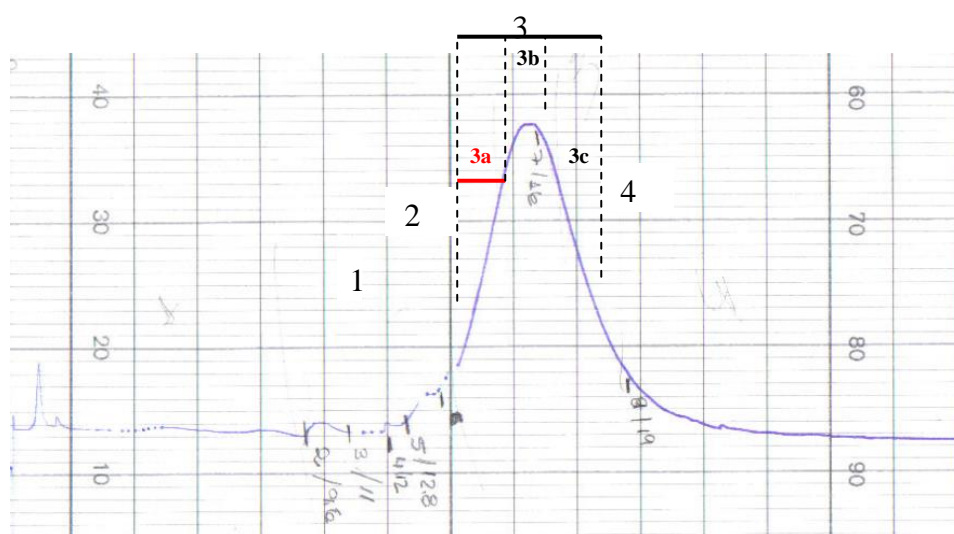


Figura 52. Gel filtração – coluna Superdex 75 - Perfil Cromatográfico do material concentrado da expressão – *Estratégia 2 de coleta dos picos*: (fração 3 coletada em três fases). A coleta foi realizada a temperatura ambiente, seguido de incubação em gelo, fluxo de 0,5 mL/min do tampão de eluição com duração de 55 minutos.

Através de análise em SDS-PAGE (figura 53) e teste de atividade sobre plaquetas demonstramos que a proteína de interesse era coletada na subida do pico (fração 3A).

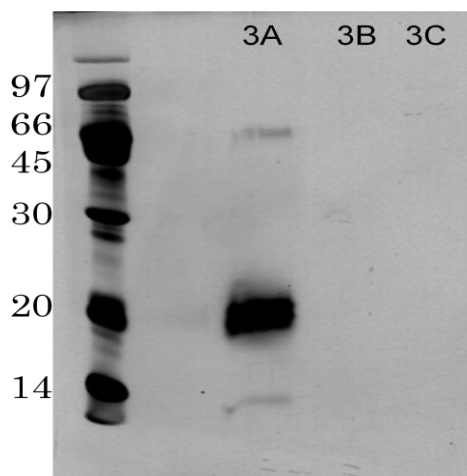


Figura 53. Perfil das 3 frações provenientes Superdex 75 (*Estratégia de coleta 2*) - Eletroforese em gel de SDS-PAGE 12,5% corado com AgNO_3 : (1) Padrão de massa molecular com valores indicados na figura; (2) 10 μg fração 3A; (3) 10 μg fração 3B; (4) 10 μg fração 3B.

A terceira tentativa ainda com a cromatografia de Gel filtração em Superdex 75 foi onde a fração 3 era coletada a cada 1mL tendo sido subdividido em 8 diferentes frações. O perfil protéico dos picos com indício de presença protéica pode ser visualizado na figura 54.

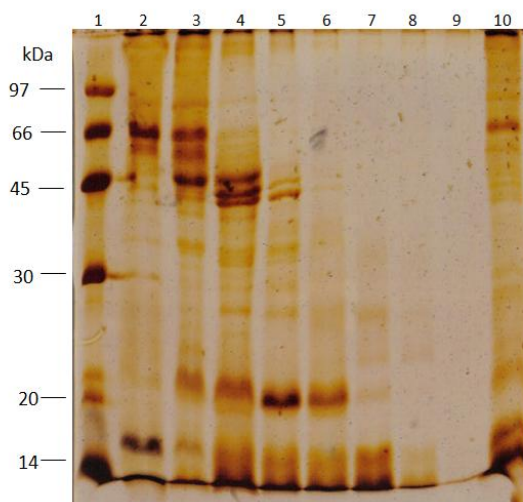


Figura 54. Perfil da fração 3 da Superdex 75 em coleta a cada mL - Eletroforese em gel de SDS-PAGE 12,5% corado com AgNO_3 : (1) Padrão de massa molecular com valores indicados na figura; (2) fração 3.1; (3) fração 3.2; (4) fração 3.3 (5) fração 3.4; (6) fração 3.5, (7) fração 3.6; (8) fração 3.7; (9) fração 3.8; (10) sobrenadante da expressão (material de entrada).

As frações denominadas 3.4 e 3.5 desta coleta a cada mL foram unidas e na Figura 55 está apresentado o perfil eletroforético final da amostra.

Uma análise importante a ser comentada é que se compararmos o perfil protéico nos SDS-PAGE demonstrados na Figura 54 e da Figura 55, são perfis obtidos de diferentes estratégias de coleta da cromatografia de gel filtração Superdex 75, mas que teoricamente deveriam estar demonstrando o isolamento de uma banda que inicialmente esperávamos possuir cerca de 20 kDa, no entanto, na Figura 55 podemos perceber que juntamente com a banda de 20 kDa temos uma importante banda protéica próxima aos 13 kDa, massa molecular esperada para a proteína recombinante sem glicosilação. A hipótese que sugerimos aqui é que como em cada uma dessas cromatografias o material utilizado era proveniente de um lote de expressão diferente, provavelmente em um destes lotes de expressão houve uma produção da proteína na forma deglicosilada, o que não acontecia nos lotes anteriores, porém, está hipótese ainda precisa ser confirmada.

A amostra da estratégia de coleta a cada mL (frações 3.4 e 3.5 reunidas) foi utilizada nos ensaios de agregação plaquetária apresentados a seguir, e o perfil protéico final pode ser observado na Figura 55.

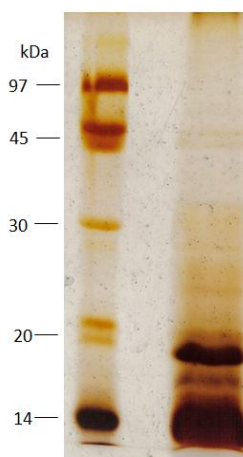


Figura 55. Perfil protéico da reunião das frações 3.4 e 3.5 coletadas da Superdex 75 - Eletroforese em gel de SDS-PAGE 12,5% corado com AgNO_3 : (1) Padrão de massa molecular com valores indicados na figura; (2) 10 μg frações 4 e 5.

4.3.8 Cromatografia de Afinidade – Heparina-Sepharose

Considerando o conhecimento prévio de que a purificação do LAPP era realizada submetendo inicialmente o extrato bruto dos complexos salivares da sanguessuga *H. officinalis* a uma Heparina-sepharose, decidimos submeter a fração 3A da estratégia de coleta fracionada (Figura 52), a cromatografia de afinidade nesta resina [Heparina–Sepharose CL6B (GE)]. O perfil cromatográfico pode ser visualizado na figura 56, com presença de dois picos principais, sendo um deles não retido e outro eluído com cerca de 500 mM de NaCl.

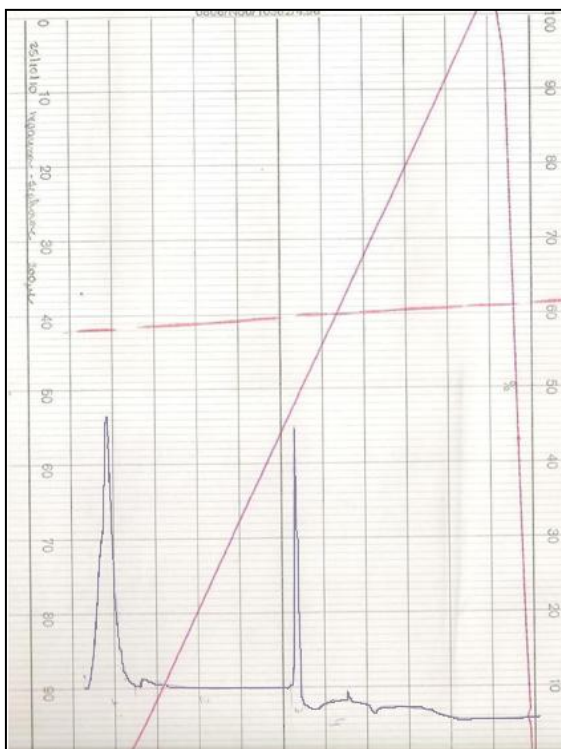


Figura 56. Perfil Cromatográfico em Heparina Sepharose CL6B - Amostra inicial: 150 µg da fração 3A da Superdex 75. A cromatografia foi realizada a temperatura ambiente, sendo as frações coletadas incubados em gelo, fluxo linear de 0 a 100 % de tampão B com fluxo de 0,3 mL/Min, com duração de 60 minutos.

Os picos protéicos foram submetidos à SDS-PAGE, a partir do qual concluímos que este não seria um bom método de purificação, já que houve grande perda de material e a amostra estava espalhada entre os picos (dados não mostrados).

Levando em conta que a purificação do LAPP era realizada submetendo o extrato bruto dos complexos salivares daquela sanguessuga à Heparina-sepharose, seguida da exclusão por massa molecular em Superose 12 e por cromatografia em fase reversa (C-18) testamos formas similares para a purificação do nosso inibidor recombinante, porém, se tivéssemos utilizado como primeira estratégia a cromatografia de afinidade em Heparina-Sepharose talvez esta teria sido uma melhor alternativa, no entanto, por questões de programação só obtivemos a resina a tempo de realizar este teste conforme mencionado na descrição do trabalho, contudo, ainda pretendemos realizar esta seqüência de cromatografias (1º. Heparina Sepharose – 2º. Superdex 75).

4.4 Rendimento protéico

Como o objetivo principal deste trabalho era a obtenção da proteína recombinante com atividade e mais pura possível, como relatado, para isso foram utilizadas inúmeras estratégias de purificação, definimos que a melhor estratégia por fim seria a coleta fracionada a cada mL em Cromatografia de gel filtração Superdex 75 com amostra proveniente da ultrafiltração tangencial em Amicon 5 kDa. Assim, os cálculos de rendimento protéico final do processo foram realizados em cima desta estratégia. Durante o desenvolvimento das diferentes etapas do trabalho duas técnicas eram utilizadas para dosagem protéica, absorvância em 280 nm e Método de Bradford (Bradford, 1976; Stoscheck, 1990). Devemos considerar que as dosagens protéicas de etapas iniciais não poderiam ser estritamente consideradas como reais já que o meio de cultura possui uma grande presença de açúcares, lipídeos, etc. que interferem grandemente na análise, portanto, não apresentamos aqui uma tabela de purificação, o que seria o ideal. No entanto, considerando o método de cromatografia de gel filtração temos que o rendimento protéico final de um processo completo de expressão do clone H06A09_pPIC9K após purificação foi de aproximadamente 10 µg/mL.

4.5 Seqüenciamento do N-terminal

Como mencionado anteriormente, apesar do material submetido ao processo de Cromatografia de Fase Reversa em C18 ter perdido atividade, esta amostra foi direcionada para obtenção do seqüenciamento do N-terminal. Assim, a banda protéica recortada e eluída do gel de SDS-PAGE (Figura 47) foi preparada para retirada do sal e de possíveis contaminantes. A amostra foi então submetida ao seqüenciamento por degradação de Edman, do qual foi obtido o seguinte resultado: EAEAYVQDEE.

Na clonagem em vetor pPIC9K, a seqüência do transcrito H06A09 foi realizada entre os sítios de restrição *EcoRI* e *NotI*. Como pode ser visualizado na figura 57, temos um esquema da clonagem com foco na região 5', onde devido o fator de secreção alfa do plasmídeo pPIC9K, alguns aminoácidos são inseridos na porção N-terminal da proteína expressa.

Contudo, o seqüenciamento confirma 6 aminoácidos introduzidos pelo vetor (EAEAYV) e 4 aminoácidos da tradução do próprio transcrito H06A09 (QDEE), nos certificando de estarmos trabalhando com a proteína recombinante de interesse.

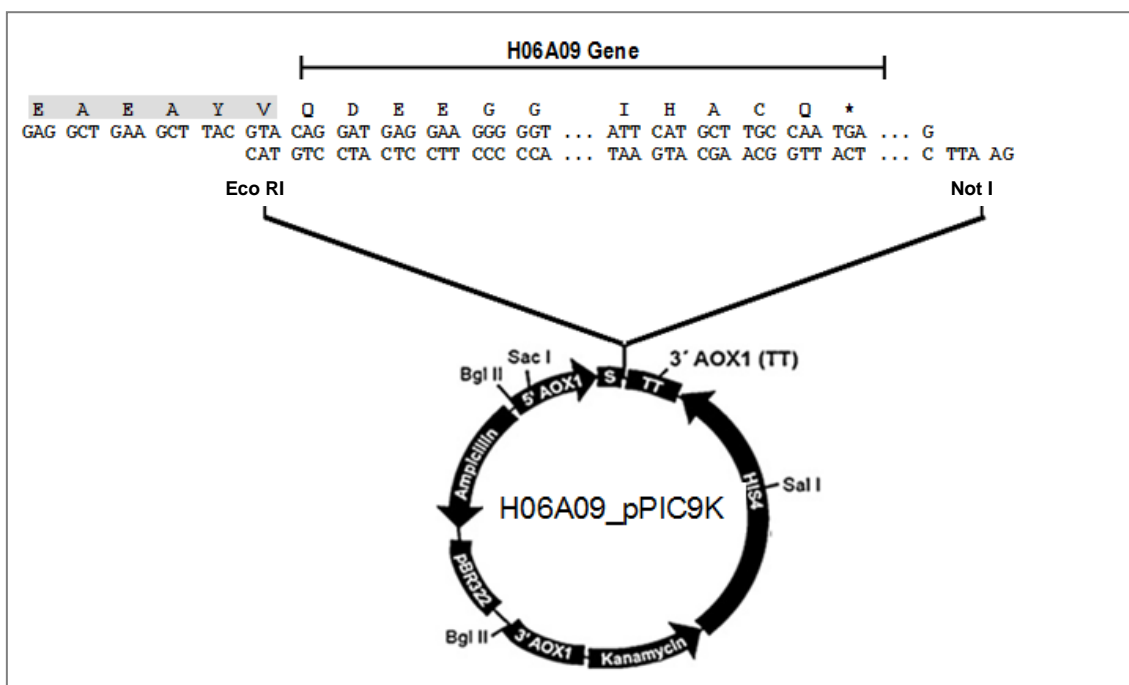


Figura 57. Esquema da clonagem do transcrito H06A09 em vetor pPIC9K entre sítios *EcoRI* e *NotI*, com aminoácidos deduzidos nas porções N e C-terminal da molécula expressa: A região em cinza apresenta os aminoácidos introduzidos pelo vetor na porção N-terminal da proteína.

4.6 Deglicosilação da Proteína recombinante

Como mencionado anteriormente, proteínas expressas em sistema eucariótico (*P.pastoris*) podem sofrer glicosilação, a proteína proveniente da etapa de cromatografia em gel filtração Superdex 75 – ‘coleta a cada mL’ foi submetida à reação de deglicosilação utilizando a enzima Endo H_f. Esta deglicosilase tem por característica clivar a ligação das longas cadeias de manose. Além disso, a predição por bioinformática de estrutura primária da proteína traduzida pelo clone nos apontava uma proteína com aproximadamente 13 kDa, A figura 37 apresentada anteriormente demonstra que, pela análise em Programa Prosite (Hulo et al., 2006), a seqüência de proteína predita para o transcrito H06A09 tinha um sítio potencial de N-glicosilação (**NDS**).

Como foi visto, na maior parte das expressões da proteína, esta era expressa com cerca de 20 kDa. No entanto, decidimos que a reação de deglicosilação seria realizada com a amostra que apresentava duas bandas, proveniente da Superdex 75 ‘coleta a cada mL’, com as bandas de 20 kDa e ~13 kDa (poço 2 - Figura 55). Após a reação de deglicosilação apenas a banda de ~13 kDa (poço 3 - Figura 58) estava presente, demonstrando que a proteína em estado deglicosilado realmente apresenta cerca de 13 kDa. Tais análises nos confirmam o padrão de N-glicosilação esperado.

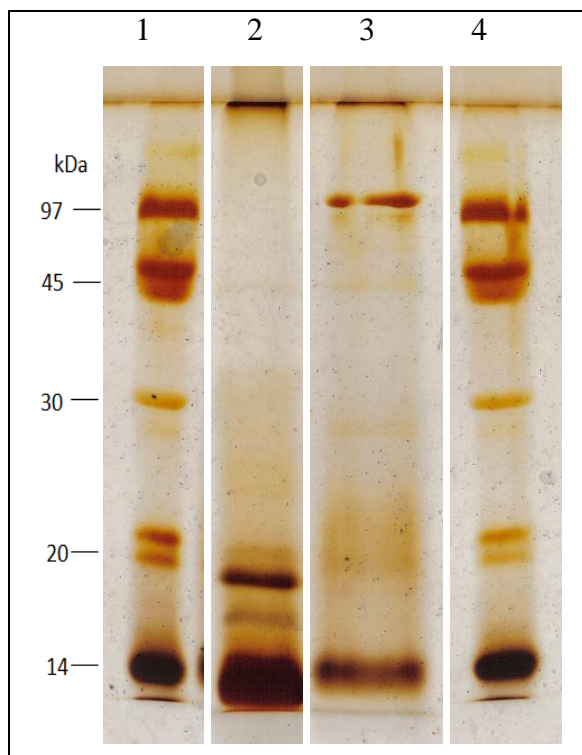


Figura 58. Deglicosilação da proteína recombinante. Eletroforese em gel de SDS-PAGE 15% corado por prata: (1) Padrão de massa molecular; (2) 10 µg da Amostra 3.4/3.5 proveniente da Superdex 75 'coleta a cada mL'; (3) 10 µg da Amostra 3.4/3.5 proveniente da Superdex 75 'coleta a cada mL deglicosilada'; (4) Padrão de massa molecular.

4.7 Atividade sobre Agregação plaquetária

4.7.1 Atividade sobre Agregação plaquetária induzida por colágeno

Devido à similaridade com a proteína LAPP, um inibidor de agregação plaquetária que atua pela via do colágeno, era esperado que a proteína recombinante, foco do presente estudo, agisse pela mesma via. Com testes iniciais da expressão em *Pichia pastoris* constatamos estar trabalhando com um inibidor de agregação plaquetária que em testes em PRP e sangue total apresentou inibição quando a indução da agregação era feita por colágeno. Estão apresentados a seguir resultados da atividade da proteína recombinante obtida após processo de purificação em Superdex 75 'coleta a cada mL'.

4.7.1.1 Ensaios com PRP

Testes de agregação plaquetária com PRP (Plasma Rico em Plaquetas) utilizando o colágeno como agonista na presença de diferentes concentrações da proteína recombinante para obtenção da Curva Dose Resposta foi realizado e pode ser visualizado na figura 59. Com essa curva foi determinando o IC50 da proteína recombinante nestas condições de ensaio.

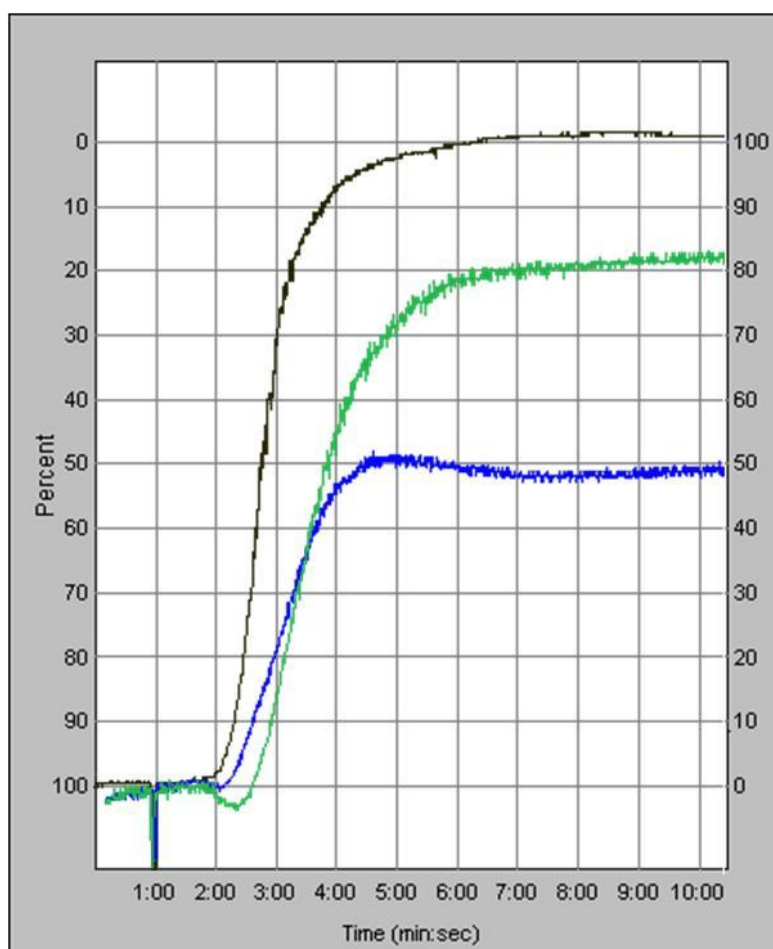


Figura 59. Ação da proteína recombinante sobre agregação plaquetária em PRP induzida por colágeno. 500 µL de PRP pré-incubados por 10 minutos a 37 °C utilizando 2,5 µg/mL de colágeno; (■) teste de agregação controle utilizando apenas colágeno como agonista, (■) 0,016 µg da proteína recombinante e (■) 0,020 µg da proteína recombinante .

Como pode ser visualizado, os testes com diversas concentrações da proteína foram realizados e a partir destes o IC50 da proteína foi estimado em 20ng [2,8nM considerando a massa molecular de 13 kDa e 2 nM considerando 20 kDa].

Em estudos com a proteína LAPP nativa e recombinante os autores não relatam o IC50 para testes em PRP (Connolly et al., 1992).

4.7.1.2 Ensaio com Plaqueta Lavada

Testes de agregação com plaqueta lavada nos mostram a ação direta da molécula na plaqueta sem a presença de fatores que possam interferir ou auxiliar no mecanismo da substância estudada.

Os testes foram realizados com plaquetas lavadas na concentração de $300 \cdot 10^9$ plaquetas/L utilizando o colágeno como agonista na presença de diferentes concentrações da proteína recombinante.

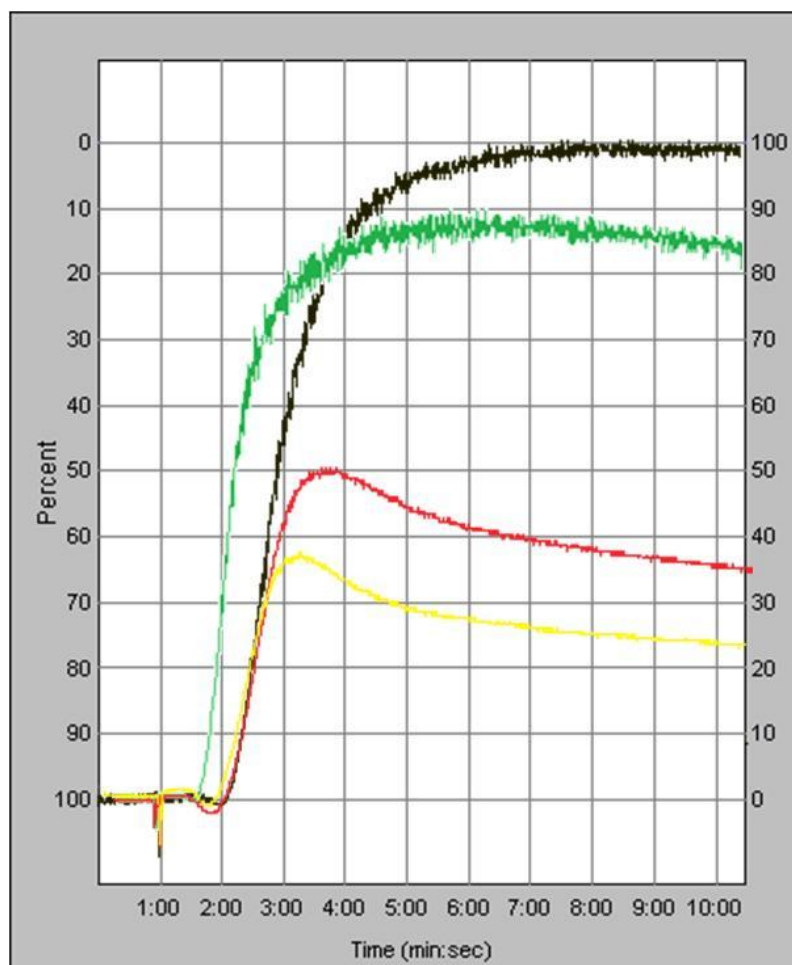


Figura 60. Ação da proteína recombinante sobre agregação plaquetária em Plaqueta Lavada induzida por colágeno. 500 µL de PRP pré-incubados por 10 minutos a 37 °C utilizando 2,5 µg/mL de colágeno; (■) teste de agregação controle utilizando apenas colágeno como agonista, (■) 0,04 µg da proteína recombinante, (■) 0,42 µg da proteína recombinante e (■) 0,33 µg da proteína recombinante.

Como pode ser visualizado na Figura 60, os testes com diversas concentrações da proteína em plaqueta lavada não demonstraram exatamente uma curva de dose resposta. Os valores na faixa dos 330, 420ng apresentavam perfis semelhantes, para nos aproximarmos dos 50% de inibição diversos testes foram realizados, através dos quais o IC₅₀ da proteína foi determinado em aproximadamente 712 ng, [101 nM considerando massa molecular de 13 kDa e 71,2 nM considerando 20 kDa], nestas condições de ensaio. Descrições sobre o LAPP nativo e o rLAPP mostram que estes, em ensaios de agregação plaquetária com plaqueta lavada induzida por colágeno, apresentam IC₅₀ de 60 nM e 100 nM (Connolly et al., 1992), respectivamente, estes resultados nos mostram que estamos trabalhando com uma molécula que, além de apresentar 45% de similaridade com o LAPP, tem uma atividade inibitória na mesma ordem de grandeza que o inibidor da sanguessuga *H. officinalis* em ensaios com plaquetas lavadas.

Ao compararmos a atividade inibitória sobre plaquetas em PRP e Plaqueta Lavada temos os valores de IC₅₀ de 20 e 720 ng, respectivamente, o que nos revela uma necessidade 36 vezes maior da presença de proteína em Plaqueta Lavada para que a inibição de 50% ocorra. Com isso, podemos sugerir que provavelmente deva existir algum fator presente no PRP que auxilie na atividade do inibidor recombinante. Esse mesmo perfil de maior atividade em PRP quando comparado com plaqueta lavada foi observado quando estudaram a atividade biológica do LAPP (Connolly et al., 1992).

4.7.2 Atividade sobre Agregação plaquetária induzida por outros agonistas

Testes de agregação plaquetária utilizando outros agonistas foram realizados para averiguar se a proteína tinha atividade inibitória por outra via além da via do colágeno.

4.7.2.1 Ensaio com PRP

Teste de agregação plaquetária feita em PRP utilizando os diversos agonistas na presença de altas doses da proteína recombinante (30 µg) nas condições descritas anteriormente. Elegemos esta concentração do inibidor já que é o valor capaz de inibir a agregação em cerca 100 % quando o colágeno é o agonista. Os resultados podem ser visualizados na figura 61.

Os agonistas utilizados nesse ensaio foram o Colágeno (como controle positivo), o ADP, o Ácido Araquidônico e a Ristocetina. Como podemos observar na Figura 61, nos testes com os demais agonistas observamos que não houve inibição na presença da proteína recombinante, no teste controle positivo com o colágeno confirmamos que cerca de 100 % da agregação na presença da proteína recombinante foi inibida.

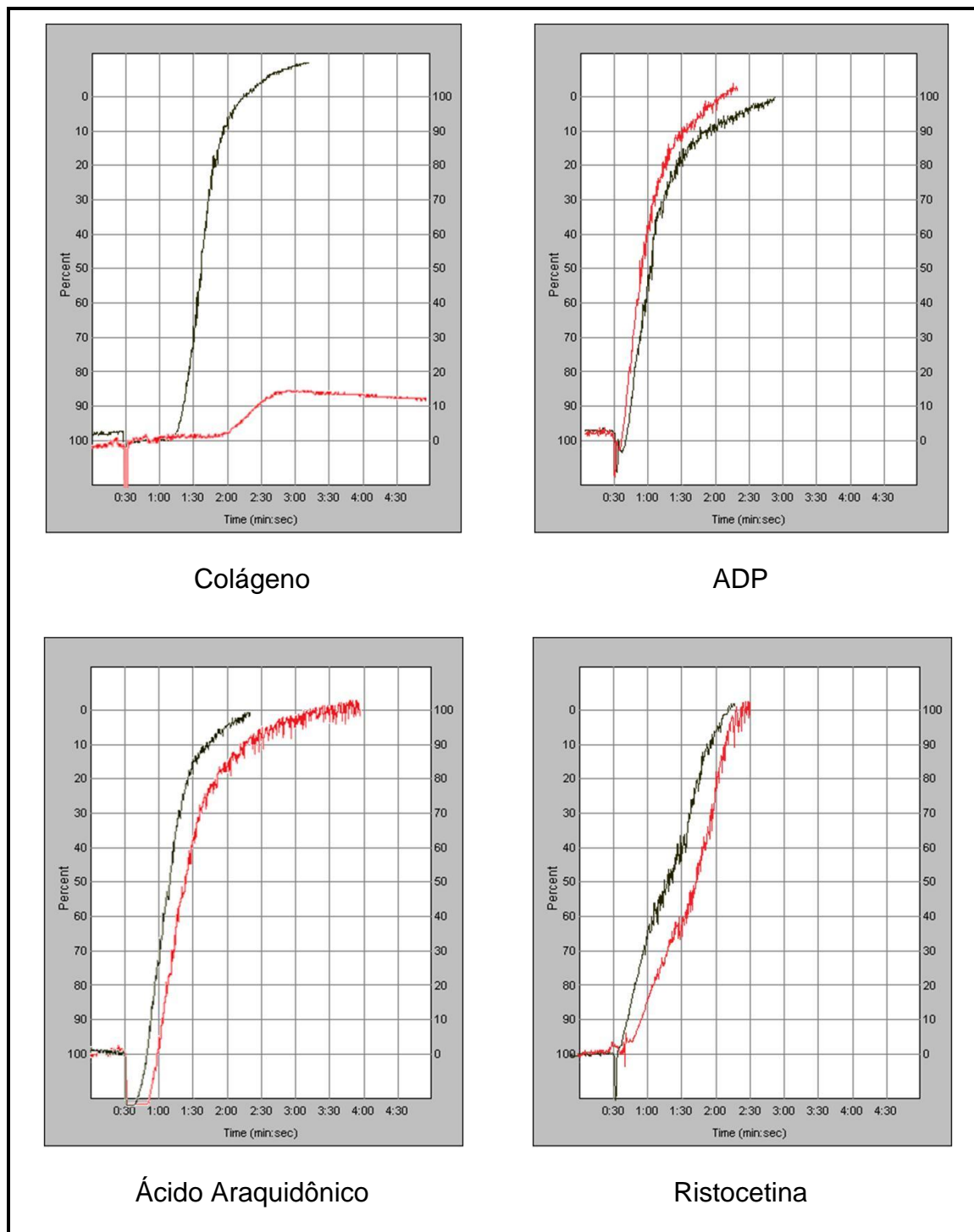


Figura 61. Ação da proteína recombinante sobre agregação plaquetária em PRP induzida pelos agonistas colágeno, ADP, Ácido Araquidônico e Ristocetina . 500 µL da PRP pré-incubados por 10 minutos a 37 °C; (■) teste de agregação controle utilizando apenas o agonista representado, e (■) teste de agregação utilizando 30 µg da proteína recombinante.

4.7.2.2 Ensaio com Plaqueta Lavada

Teste de agregação plaquetária feita em plaqueta lavada nas condições descritas anteriormente, onde foram utilizados os diversos agonistas na presença de 800 µg da proteína recombinante. Neste ensaio foram utilizados além do colágeno, ADP, Ácido Araquidônico e Ristocetina e trombina. Da mesma forma elegemos esta concentração do inibidor já que é o valor capaz de inibir a agregação em cerca 100% quando o colágeno é o agonista em plaqueta lavada. Os resultados podem ser visualizados na figura 62.

Podemos observar na Figura 62, que da mesma forma que nos testes realizados em PRP, a proteína teve ação inibitória apenas quando utilizado o colágeno como agonista.

Vale ressaltar que o controle sem a presença da proteína recombinante dos testes com ADP, Ácido Araquidônico e Ristocetina não atingiram 100 % de agregação, porém, apesar desse valor, o ensaio na presença da proteína recombinante teve o mesmo padrão, sugerindo que a presença da nossa molécula não interfere na atividade agregante junto aos demais agonistas testados.

Estes resultados em conjunto nos levam a concluir que, assim como o LAPP, a nossa proteína recombinante tem atividade inibitória apenas pela via do colágeno, e que apresenta IC₅₀ de 2,8 e 101 nM (considerando a massa molecular de 13 kDa) em PRP e plaqueta lavada, respectivamente, sendo um valor maior que o IC₅₀ do LAPP nativo (60 nM) em plaqueta lavada e próximo do rLAPP expresso em *Saccharomyces cerevisiae* BJ1995 (100 nM).

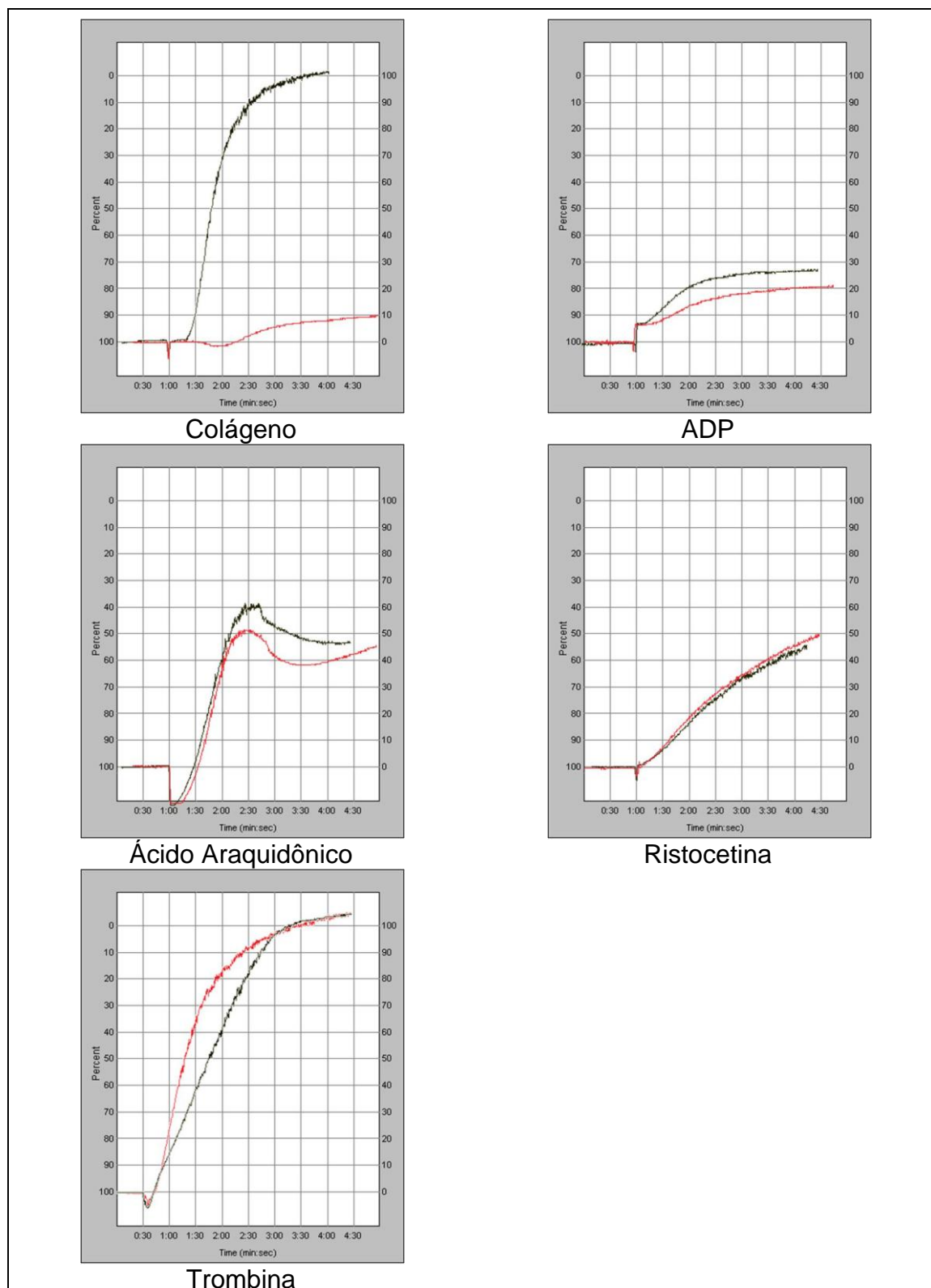


Figura 62. Ação da proteína recombinante sobre agregação plaquetária em Plaqueta Lavada induzida pelos agonistas colágeno, ADP, Ácido Araquidônico, Ristocetina e Trombina. 500 µL da PRP pré-incubados por 10 minutos a 37 °C; (■) teste de agregação controle utilizando apenas o agonista representado, e (■) teste de agregação utilizando 800 µg da proteína recombinante.

4.8 Estudos de ação sobre receptores plaquetários – Citometria de Fluxo

Em todos os ensaios de citometria de fluxo foram usadas plaquetas na concentração de 300×10^9 plaquetas/L e analisados 10.000 eventos. O método estatístico aplicado para análise dos resultados foi o "*t-student*".

Utilizando a citometria de fluxo, observamos a interação da proteína recombinante com alguns receptores presentes na membrana plaquetária.

A interação do inibidor de agregação com os receptores plaquetários GPIb α (complexo GP Ib-IX-V), $\alpha_2\beta_1$, GPIIb (α IIb β_3), GPIV e P-selectina induzida por trombina foram analisadas pela marcação dos mesmos com anticorpos monoclonais específicos CD42b, CD49b(α_2) e CD29(β_1); CD41a, CD36 e CD62P, respectivamente.

4.8.1 Integrina $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa)

A integrina $\alpha_2\beta_1$ é formada por uma subunidade α (CD49) onde ocorre a ligação com o colágeno, e a subunidade β (CD29). Esta é receptor universal para colágeno do tipo I.

Ensaio de citometria com marcação das subunidades α_2 e β_1 foram realizados com PRP e com plaqueta lavada. Os gráficos da população de plaquetas marcadas com IgG, controle e incubadas com a proteína podem se visualizadas na figura 63 e na tabela 11, onde está demonstrada a ação da proteína recombinante sobre essa subunidade.

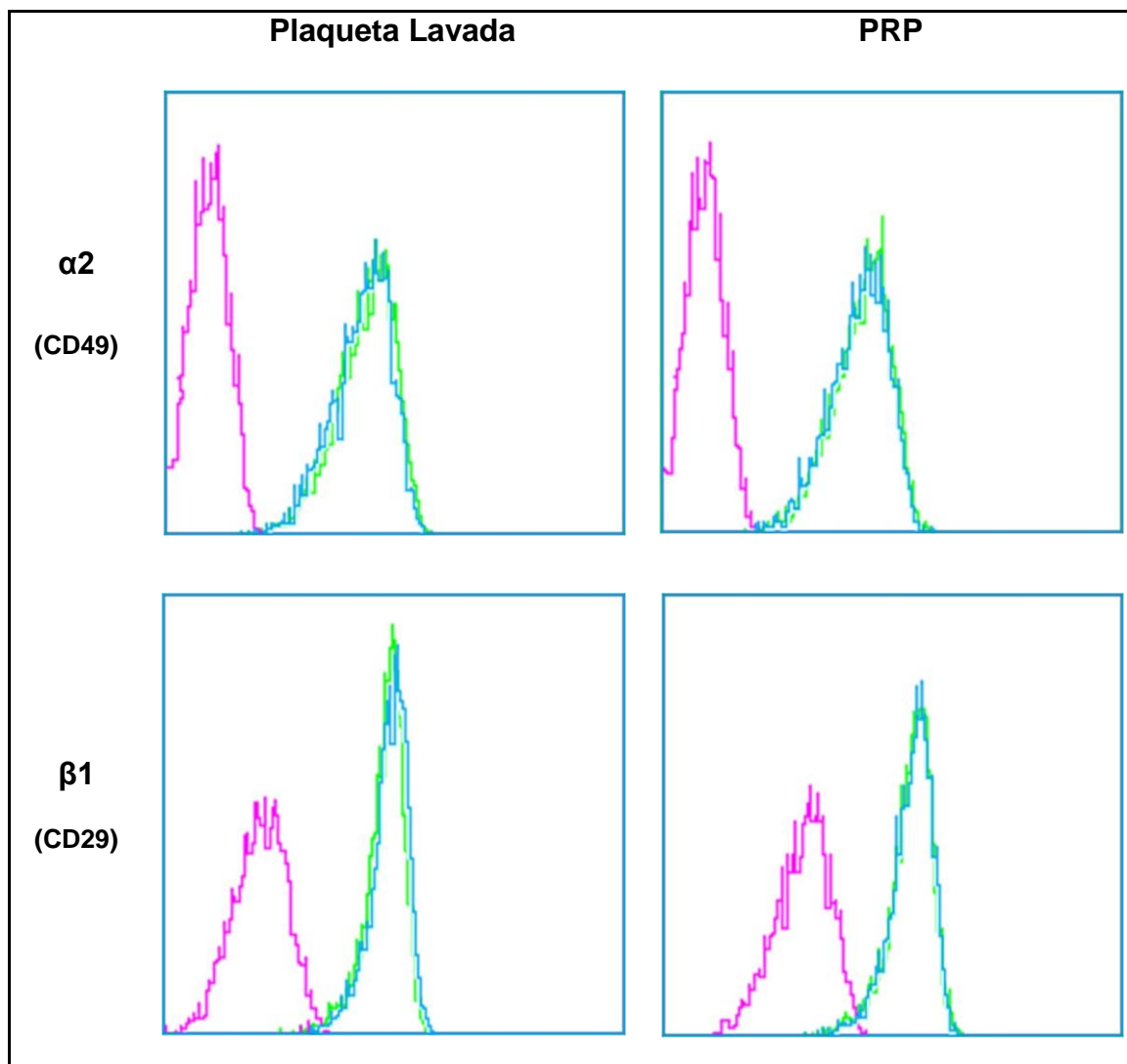


Figura 63. Ação da proteína recombinante sobre as subunidades α_2 e β_1 da integrina $\alpha_2\beta_1$. Nos ensaios estes foram pré-incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente com a proteína recombinante na concentração final de 800ng, adicionadas de Soro Fetal Bovino 10% e concentrações saturantes do anticorpo monoclonal CD49 FITC-conjugado e CD 29 PE - Conjugado. Controle isotipo (■), Controle CD49 e CD29 (■) e Plaqueta incubada com Amostra (■). Amostras submetidas à citometria de fluxo após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente na ausência de luz.

Tabela 11 - Mediana da Intensidade de Fluorescência dos anticorpos com as subunidades da Integrina $\alpha 2\beta 1$ na presença de ausência da proteína recombinante.

	Plaqueta Lavada		PRP	
	Amostra	Controle	Amostra	Controle
CD49 - $\alpha 2$	60,9 \pm 5,3	62,1 \pm 4,5	58,1 \pm 7,2	57,5 \pm 5,8
	P=0,363		P= 0,429	
CD29 – $\beta 1$	135,1 \pm 27,1	127 \pm 27,7	134,2 \pm 18,8	140,9 \pm 23,1
	P= 0,019		P= 0,331	

Observando os gráficos podemos notar que não houve deslocamento visível das populações controle e das populações incubadas com a amostra. Analisando os dados da tabela 11 podemos observar que a proteína recombinante realmente não interfere nessa subunidade, pois observando os valores de média e desvio padrão vemos que valores de controle e da amostra são muito próximos, com confiabilidade confirmada pelo teste T.

Através deste ensaio podemos concluir que diferentemente do LAPP a molécula alvo do nosso estudo, apesar de apresentar similaridade estrutural de 45% e ser também um inibidor pela via do colágeno, não age no domínio $\alpha 21$ da integrina $\alpha 2\beta 1$.

4.8.2 GPIIb/IIIa (CD41a), GPIV (CD36) e P-selectina (CD62P)

A glicoproteína IIb/IIIa é um heterodímero cálcio-dependente que na mudança para o estado ativo da plaqueta estes se tornam ativos possibilitando a agregação entre as plaquetas.

A GPIV é a principal proteína encontrada na superfície da membrana plaquetária e expressa por outras células e faz a interação da plaqueta com colágeno.

P-selectina, que fica armazenada intracelularmente nos grânulos alfa e nos corpúsculos de Weibel-Palade, durante a ativação plaquetária é rapidamente redistribuída para a superfície celular, e faz a mediação das interações entre plaquetas e células endoteliais com leucócitos. Para sua externalização na

membrana plaquetária durante os ensaios foi necessária sua ativação com adição de trombina, o que se fosse realizado em PRP iria induzir a agregação por outra via.

As marcações foram realizadas também utilizando PRP e plaqueta lavada. O gráfico da população de IgG, controle e incubadas com a proteína pode ser visualizados na figura 64. Na tabela 12 temos os valores da interferência da proteína recombinante sobre as proteínas de membrana na citometria de fluxo, marcada pelos anticorpos CD41a, CD36 e CD62P conjugados com FITC.

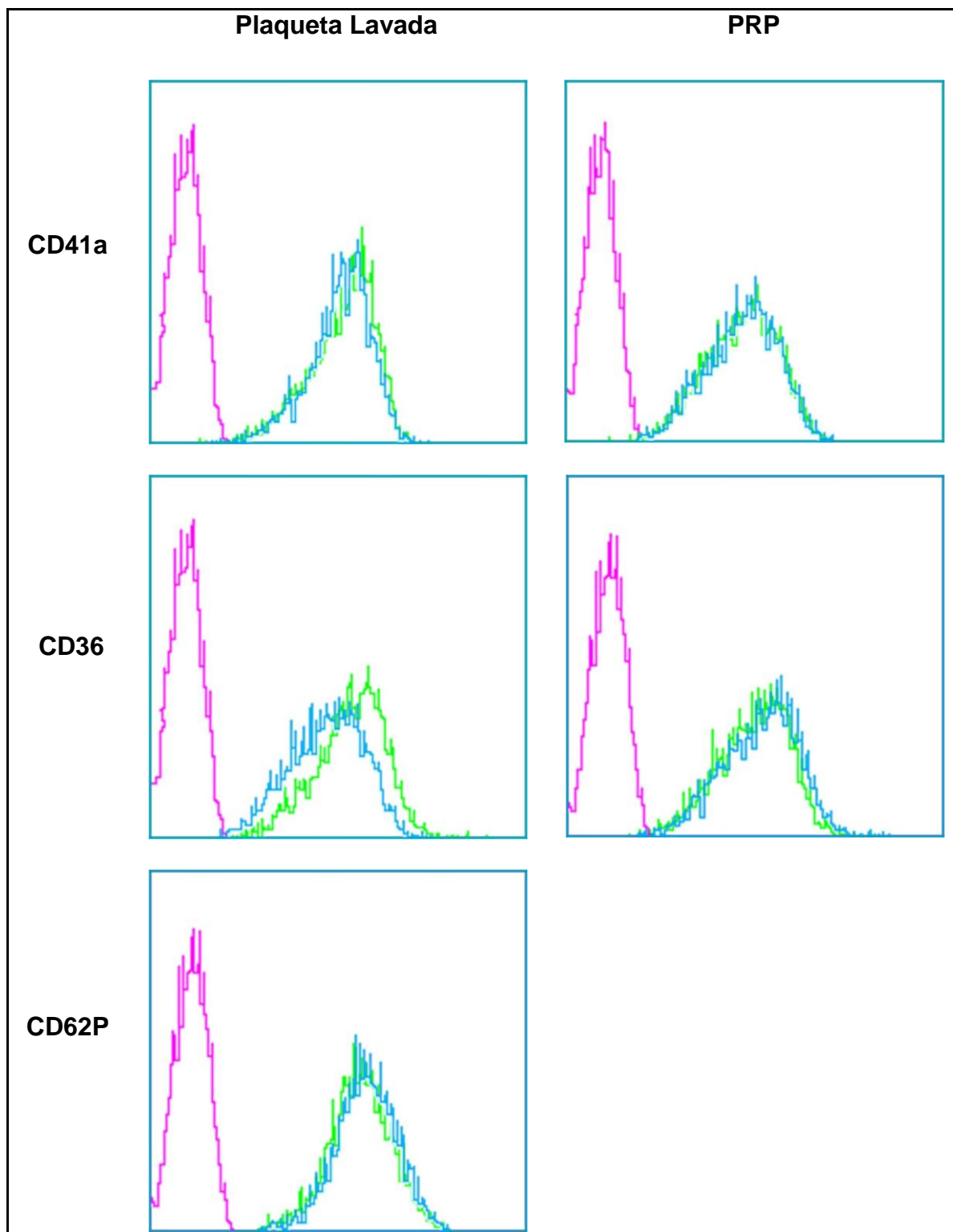


Figura 64. Ação da Proteína recombinante sobre a subunidade IIb do complexo GPIIb/IIIa, GPIV (CD36) e P-Selectina (CD62P). Nos ensaios estes foram pré-incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente com a proteína recombinante na concentração final de 800ng, adicionadas de Soro Fetal Bovino 10% e concentrações saturantes do anticorpo monoclonal CD49 FITC-conjugado e CD 29 PE - Conjugado. Controle isotipo (■), Controle CD41a, CD36 e CD62P (■) e Plaquetas incubadas com Amostra (■). Amostras submetidas à citometria de fluxo após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente na ausência de luz.

Tabela 12 - Mediana da Intensidade de Fluorescência dos anticorpos CD41a, CD36 e CD62P na presença de ausência da proteína recombinante.

	Plaqueta Lavada		PRP	
	Amostra	Controle	Amostra	Controle
CD41a	72,7± 27,9	75,3± 23,3	58,4± 10,3	67,5± 17,0
	P=0,67		P= 0,34	
CD36	83,3± 34,3	93,0± 41,2	72,6± 22,5	75,9± 26,2
	P=0,539		P= 0,059	
CD62P	126,2 ± 113,8	99,0± 55,3		
	P=0,521			

Como podemos observar na figura 64 não observamos diferença aparente no deslocamento de transluminescência das populações incubadas com a proteína recombinante e o controle com CD41A e CD62P. O ensaio com CD36 em plaqueta lavada apresentou um deslocamento aparente, no qual houve uma diminuição de pouco mais de 10% na presença da proteína recombinante (tabela 12), porém, esses dados através da análise estatística não apresentaram uma diferença significativa.

4.8.3 Complexo GPIb-IX-V

O complexo GPIb-IX-V é formado por 4 subunidades e é responsável pela ligação da plaqueta ao colágeno subendotelial através do FvW. O modelo de adesão sugere que este seja o primeiro complexo a se ligar e firmar essa adesão, possibilitando as ligações com as outras moléculas. A subunidade α (CD42a) tem o sítio de ligação para o FvW, e através desta subunidade, observa-se interferência direta da ligação GPIb-IX-V ao FvW.

A marcação da subunidade Iba foi realizada utilizando também PRP e plaqueta lavada. Os gráficos da população de IgG, controle e incubadas com a proteína podem ser visualizados na figura 65. Os valores de transluminescência podem ser visualizados na tabela 13.

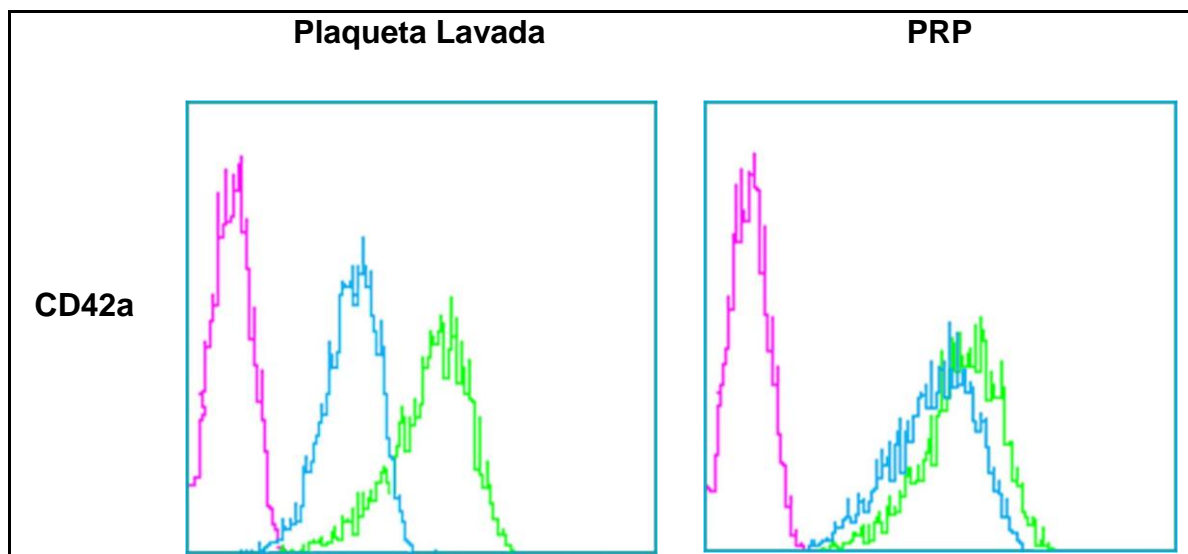


Figura 65. Ação da Proteína recombinante sobre a subunidade Iba do complexo GPIb-IX-V. Nos ensaios estes foram pré-incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente com a proteína recombinante na concentração final de 800ng e, adicionadas de Soro Fetal Bovino 10% e concentrações saturantes do anticorpo monoclonal CD42b FITC-conjugado. Controle isotipo (■), Controle CD42b (■) e Plaqueta incubada com Amostra (■). Amostras submetidas à citometria de fluxo após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente na ausência de luz.

Tabela 13 - Mediana da Intensidade de Fluorescência dos anticorpos CD42a na presença de ausência da proteína recombinante.

	Plaqueta Lavada		PRP	
	Amostra	Controle	Amostra	Controle
CD42a	51,3± 24,7	153,7± 60,5	66,1 ± 24,8	135,9 ± 26,2
	P=0,062		P= 0,017	

A proteína recombinante, como pode ver visualizado na Figura 65 e na Tabela 13, interferiu significativamente na interação da glicoproteína Iba do complexo GPIb-IX-V com seu anticorpo específico, diminuindo a transluminescência em relação ao controle

Isso nos faz sugerir que o inibidor possivelmente esteja acoplado ao sítio de ligação onde o anticorpo específico se liga, que é região receptora para ligação do FvW e trombina.

Podemos notar que o deslocamento foi maior em plaqueta lavada em comparação com PRP, porém estatisticamente a confiabilidade dos testes é maior em PRP (0,017) do que em plaqueta lavada (0,062).

Uma das formas da plaqueta se ligar ao colágeno é pela via do complexo GPIb-IX-V, onde este se liga ao FvW que se liga ao colágeno pelo domínio α_2I . O LAPP age se ligando ao domínio α_2I do colágeno, impedindo assim o FvW de se ligar, já a proteína recombinante alvo deste estudo se liga a subunidade Iba do complexo GPIb-IX-V, impedindo que o FvW se ligue.

Temos como perspectiva realizar estes testes com o domínio Ialla do colágeno como o LAPP. Supondo que nosso inibidor tenha o potencial de se ligar tanto no domínio α_2I do colágeno quanto na subunidade Iba do complexo GPIb-IX-V, impediria, assim, a ligação de outra plaqueta ao sítio de colágeno e bloquearia a plaqueta de se ligar ao FvW.

Considerando esta suposição, e como este complexo plaquetário, além de ter sítio para ligação ao FvW também tem sítio de ligação para trombina, nos testes que realizamos com a trombina como agonista poderíamos esperar que haveria alguma inibição, no entanto, vale ressaltar que a trombina também ativa a plaqueta pelos receptores PAR1 e PAR2, assim, mesmo se o sítio de ligação pelo complexo estivesse bloqueado, a trombina poderia estar ativando a plaqueta pelos outros receptores.

Hoje se sabe que a exposição da plaqueta ao colágeno, é essencial para uma firme adesão da plaqueta, pois a partir desta firme adesão, a plaqueta é ativada, dando continuidade para formação do trombo hemostático. A primeira molécula a fazer ligação é o complexo GPIb-IX-I, provavelmente junto com a integrina $\alpha_2\beta_1$ e GPVI. Porém, se a ligação de GPIb-IX-V não for consolidada, a ligação da integrina $\alpha_2\beta_1$ e GPVI ficam comprometidas. (Ruggeri, 2007)

A ativação plaquetária induzida por colágeno pode ser dividida em três etapas principais: (1) interação das plaquetas com o complexo formado entre o colágeno e o FvW, que leva ao aumento do Ca^{2+} intracelular; (2) liberação do conteúdo granular (grânulos densos e grânulos alfa); (3) exposição e ativação do receptor GPIIb-IIIa (integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$), levando à ativação das plaquetas adjacentes para formação do trombo plaquetário (Surin et al., 2007).

Sabe-se que o LAPP atua tanto na ligação do colágeno ao FvW quanto no receptor $\alpha_2\beta_1$, além disso, tal molécula foi estudada na deposição de plaquetas em superfícies ricas em colágeno sob condições de fluxo. O rLAPP é capaz de inibir a adesão de plaquetas no colágeno tipo I, III e IV e inibe parcialmente colágeno tipo VI, inibindo de forma dose-dependente a ligação de FvW para o colágeno tipo III. Outro estudo com o rLAPP demonstrou que o mesmo causa uma inibição pronunciada da deposição de plaquetas em placas ateroscleróticas das artérias coronárias humanas, por outro lado, não apresentou efeitos sobre as matrizes de culturas de HUVECs (células endoteliais da veia umbilical). Van Zanten et al. (1995) concluem neste mesmo trabalho que o rLAPP é um inibidor potente adesão de plaquetas, com alta taxa de cisalhamento, que se liga ao colágeno e trabalha inibindo a sua ligação ao FvW. Deste modo, no nosso estudo dá início para estudos futuros, como por exemplo, a investigação da ação da proteína recombinante em outros tipos celulares com matriz rica em colágeno; além disso, estudos com os diferentes tipos de colágeno também poderão ser focalizados.

Como mencionamos então, podemos concluir que o inibidor foco do nosso estudo, age por uma via diferente da via de ação do LAPP. Sabe-se que apenas após a firme ligação do complexo GPIb-IX-V ao colágeno as outras moléculas de adesão como $\alpha_2\beta_1$, GPVI fazem as ligações de adesão. E poderíamos sugerir que a proteína recombinante expressa pelo clone H06A09 seria um eficiente inibidor comparado com o LAPP, por inibir o complexo GPIb-IX-V, uma via que precisa estar bem estabilizada para dar seqüência aos seguintes eventos, como a ligação da integrina $\alpha_2\beta_1$. Por outro lado, como ambos são inibidores com IC50 próximos (em torno de 100nM para plaqueta lavada) não podemos mencionar diferenças entre a potência na atividade inibitória sobre a agregação plaquetária.

Já que temos em mãos um novo inibidor de agregação plaquetária pela via do colágeno é importante ressaltar o fato de que este agonista plaquetário é o componente mais trombogênico da matriz subendotelial, como já descrito ele se liga

a seus receptores específicos na superfície plaquetária, GPVI e GPIa-IIa (integrina $\alpha 2\beta 1$) para promover a adesão, ativação e agregação plaquetária no local da lesão vascular. No entanto, como descrevemos em todo o contexto do trabalho a interação das plaquetas com o colágeno é bem mais complexa do que uma simples interação ligante-receptor fazendo também com que nossa molécula tenha um vasto campo de ações a ser investigado (Surin et al., 2007).

Por outro lado, pensando na biologia do parasita de onde esta molécula é proveniente, um outro enfoque e que precisamos discutir também para as demais isoformas encontradas na biblioteca de cDNA dos complexos salivares de sanguessugas *H. depressa*, é o seu papel na alimentação do animal, ou seja, não podemos deixar de levar em consideração que estas moléculas se encontram nativas nos complexos salivares de sanguessugas, e estes parasitas necessitam de substâncias que promovam a fluidez do sangue para o sucesso de sua alimentação. Nesta mesma sanguessuga já foi descoberta outra molécula com ação em plaquetas, denominada Hementerina, que por sua vez age em plaquetas pela via nitridérgica (Chudzinski-Tavassi et al., 2003), foi descrito também um inibidor de FXa da coagulação sanguínea denominado Lefaxin (Faria et al., 1999) e através de análises proteômica e transcriptômica dos complexos salivares pudemos mapear várias outras potenciais moléculas com papel na hemostasia (Faria et al., 2005; Ricci-Silva et al., 2005), assim, fica claro que estes parasitas possuem um verdadeiro arsenal que os armam contra a coagulação do sangue do hospedeiro do qual se alimentam, e seria de grande importância para a compreensão da biologia do parasita descrevermos os papéis de cada uma das substâncias ali presentes.

De uma forma geral, foi visto que o extrato bruto salivar é capaz de inibir a agregação plaquetária por diversos agonistas, com exceção da trombina. Isso mostra que diversos mecanismos estão envolvidos para a manutenção do sangue fluído em sua alimentação, e a molécula descrita no presente trabalho é mais uma peça nesse arsenal.

A proposta inicial do trabalho não era trivial já que se tratava de uma molécula completamente nova e que apesar de alguma similaridade estrutural com uma molécula já descrita na literatura, nada mais sabíamos a seu respeito. Quando buscamos moléculas em bibliotecas de cDNAs devemos considerar que apesar de ser uma fonte abundante para novas descobertas, a única informação que conhecemos a respeito das proteínas ali representadas pelo cDNA, é sua seqüência

de aminoácidos predita, e que se trata de um universo a ser descoberto, o que reforçou o desafio de caracterizar uma nova molécula principalmente funcionalmente.

O fato de termos obtido, através da expressão heteróloga, uma molécula com atividade, e termos conseguido iniciar sua caracterização funcional, além de obviamente nos fazer alcançar nossos objetivos iniciais, enaltece o trabalho, já que precisamos ressaltar a importância na descoberta de agentes antiplaquetários para estudos que futuramente poderão visar a clínica médica, pois plaquetas estão diretamente envolvidas em diversas patologias importantes, sejam estas síndromes ou quadros trombóticos graves como a trombose arterial, por exemplo (Gregg e Glodschimidt-Clermont, 2003).

Além disso, hoje, cada vez mais se busca tratamentos específicos para cada doença. Como citado anteriormente drogas antiplaquetárias como a aspirina, Tienopiridinas e Clopidrogel são rotineiramente utilizadas na prevenção de eventos vasculares em pacientes. (Drouet et al., 2010).

Por outro lado, mas também considerando que cada vez mais a ciência tem visionado o estudo de moléculas com potencial terapêutico, uma vez que, até o momento nenhum fármaco utilizado na terapia antiplaquetária mostrou-se suficientemente potente, seguro e ativo para a prevenção da trombose arterial, e mesmo os mais comumente utilizados, como o ácido acetilsalicílico (AAS), Clopidogrel, Tirofibano ainda apresentam uma ou mais limitações, que incluem: pouca eficácia, risco significativo de hemorragias, irritabilidade gástrica, resistência ao fármaco ou a via de administração exclusivamente parenteral (Hamilton, 2008), estas e muitas outras dificuldades encontradas no estudo de antiplaquetários que promovam um controle efetivo dos eventos vasculares, reforçam a importância de estudos como o nosso que vão em busca, através da biodiversidade brasileira, de compostos que possam ser estudados no desenvolvimento de novos agentes antiplaquetários, tornando-os promissores.

Outro fator que favorece o presente estudo é que o processo de produção do inibidor utilizando o sistema *Pichia pastoris* é aceitável, não apenas pela indústria farmacêutica, mais também segue técnicas atuais da literatura mundial, onde se observa utilização crescente de sistema eucariótico para obtenção de proteínas recombinantes. Os medicamentos obtidos por meios biotecnológicos estão cada vez mais sendo utilizados na clínica médica e conseqüentemente cresce a cada ano o

investimento mundial na produção e comercialização desses medicamentos. E como já foi citado anteriormente uma grande vantagem dos sistemas eucariotos sobre a obtenção em sistemas procariotos são as modificações pós traducionais e estrutura terciária que em geral é mais similar com a proteína nativa, se esta vem de organismos eucarióticos, como é o caso do nosso inibidor (Schmidt, 2004; Macauley-Patrick et al., 2005).

Assim, de modo geral, temos em mãos uma nova molécula inibidora de agregação plaquetária que age inibindo pela via do colágeno através de sua ligação ao receptor $Ib\alpha$, trata-se de uma molécula diferente das demais descritas até o momento, mesmo com sua similaridade estrutural em 45% quando comparada ao LAPP. E pelos inúmeros motivos discutidos até agora, estamos com o presente trabalho abrindo um leque de novas investigações a serem realizadas com esta promissora substância.

5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nos permitem concluir que:

- A clonagem do transcrito H06A09 em vetor pAE foi bem sucedida, porém a expressão em diferentes linhagens de *E. coli*, não acarretaram a obtenção de uma molécula recombinante com atividade;
- O transcrito H06A09 foi clonado em pPIC9K e expresso em *P. pastoris* linhagem GS115, a expressão foi melhor sucedida em meio de cultura BMGY, com indução de 0,5% de metanol a cada 24 h por um total de 72 h, a 28 °C com agitação a 260 rpm;
- O melhor método de purificação da proteína recombinante ativa, avaliado no estudo, foi a diálise e concentração por ultrafiltração tangencial em Amicon 5 kDa seguido de cromatografia de gel filtração em Superdex 75 com coletada fracionada a cada mL do pico principal protéico;
- A proteína recombinante obtida apresentou níveis de glicosilação que acarretaram a presença de banda protéica em SDS-PAGE de cerca de 20 kDa que quando deglicosilada migrava para cerca de 13 kDa, dependendo do lote de expressão uma banda de cerca de 13 kDa também era expressa, sugerimos que talvez a proteína estivesse sendo expressa das duas formas, glicosilada (~20 kDa) e não glicosilada (~13 kDa);
- O N-terminal da proteína recombinante foi obtido confirmando a expressão correta e parte da estrutura primária predita para a tradução dos nucleotídeos do clone H06A09;
- A proteína apresentou atividade inibitória sobre plaquetas induzidas pela via do colágeno, tanto sobre PRP quanto em plaqueta lavada com IC50 de 2,8 nM e 101 nM, respectivamente;

- Ensaios em citometria de fluxo mostraram que a molécula recombinante age sobre a subunidade Ib α do complexo GPIb-IX-V, e provavelmente, deva acarretar na inibição da agregação por inibir a adesão via ligação de colágeno ao FvW.

REFERÊNCIAS*

Adams GL, Manson RJ, Turner I, Sindram D, Lawson JH. The balance of thrombosis and hemorrhage in surgery. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2007;21(1):13-24.

Alvarez Flores MP, Fritzen M, Reis CV, Chudzinski-Tavassi AM. Losac, a factor X activator from *Lonomia obliqua* bristle extract: its role in the pathophysiological mechanisms and cell survival. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;343(4):1216-23.

Alvarez-Flores MP, Furlin D, Ramos OH, Balan A, Konno K, Chudzinski-Tavassi AM. Losac, the first hemolin that exhibits procogulant activity through selective factor X proteolytic activation. *J Biol Chem.* 2011;286(9):6918-28.

Andrews RK, López JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29(1):91-105.

Arnaout MA. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood.* 1990;75(5):1037-50.

Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.* 1999;10(5):411-21.

Barnes MJ, Knight CG, Farndale RW. The collagen-platelet interaction. *Curr Opin Hematol.* 1998;5(5):314-20.

Baskova IP, Nikonov GI. Destabilase: an enzyme of medicinal leech salivary gland secretion hydrolyzes the isopeptide bonds in stabilized fibrin. *Biokhimiia.* 1985;50(3):424-31.

Batista IF, Chudzinski-Tavassi AM, Faria F, Simons SM, Barros-Batesti DM, Labruna MB, Leão LI, Ho PL, Junqueira-de-Azevedo IL. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Toxicon.* 2008;51(5):823-34.

Batista IF, Ramos OH, Ventura JS, Junqueira-de-Azevedo IL, Ho PL, Chudzinski-Tavassi AM. A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. *Arch Biochem Biophys.* 2010;493(2):151-6.

Berndt MC, Shen Y, Dopheide SM, Gardiner EE, Andrews RK. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost.* 2001;86(1):178-88.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Blann AD, Lip GY. Hypothesis: is soluble P-selectin a new marker of platelet activation? *Atherosclerosis*. 1997;128(2):135-8.

Blankenship DT, Brankamp RG, Manley GD, Cardin AD. Amino acid sequence of ghillanten: anticoagulant-antimetastatic principle of the South American leech, *Haementeria ghilianii*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;166(3):1384-9.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

Broze Jr GJ . Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Annu Rev Med*. 1995;46:103-12.

Production, purification and characterisation of recombinant Fabsin, a novel antistasin-type proteinase inhibitor FEMS 2005

Buch MH, Prendergast BD, Storey RF. Antiplatelet therapy and vascular disease: an update. *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2010;4(4):249-75.

Castro HC, Ferreira BLA, Nagashima T, Schueler A, Rueff C, Camisasca D, Moreira G, Scovino G, Borges L, Leal M, Filgueira M, Paschoal P, Bernardo V, Bourguinhon S, Rodrigues CR, Santo DO. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;42(5):321-32.

Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*. 2000;24(1):45-66.

Chakrabarti R, Das SK. Advances in antithrombotic agents. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2007;5(3):175-85.

Chopin V, Bilfinger TV, Stefano GB, Matias I, Salzet M. Amino-acid-sequence determination and biological activity of cytin, a naturally occurring specific chymotrypsin inhibitor from the leech *Theromyzon tessulatum*. *Eur J Biochem*. 1997;249(3):733-8.

Chopin V, Matias I, Stefano GB, Salzet M. Amino acid sequence determination and biological activity of therin, a naturally occurring specific trypsin inhibitor from the leech *Theromyzon tessulatum*. *Eur J Biochem*. 1998a;254(3):565-70,.

Chopin V, Salzet M, Baert J, Vandenbulcke F, Sautière PE, Kerckaert JP, Malecha J. Therostasin, a novel clotting factor Xa inhibitor from the rhynchobdellid leech, *Theromyzon tessulatum*. *J Biol Chem*. 2000; 275(42):32701-7.

Chopin V, Stefano GB, Salzet M. Amino-acid-sequence determination and biological activity of tessulin, a naturally occurring trypsin-chymotrypsin inhibitor isolated from the leech *Theromyzon tessulatum*. *Eur J Biochem*. 1998b;258(2):662-8.

Chudzinski-Tavassi AM, Kelen EMA, Paula Rosa AP, Loyau S, Sampaio CAM, Bom C, Anglés-Cano E. Fibrino(geno)lytic properties of a purified metalloproteinase from the leech *Haementeria depressa*. *Thromb Haemost*. 1998;80:155-60.

Chudzinski-Tavassi AM, Bermejo E, Rosenstein RE, Faria F, Sarmiento MIK, Alberto F, Sampaio UM, Lazzari MA. Nitridergic platelet pathway activation by hementerin, a metalloprotease from the *Haementeria depressa* leech. *Biol Chem*. 2003;384(9):1333-9.

Ciprandi A, Horn F, Termignoni C. Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes. *Rev Bras Hematol. Hemoter*. 2003;25(4):250-62.

Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet GPIb-V-IX complex. Structure, function, physiology, and pathology. *Semin Thromb Hemost*. 1995;21(2):130-6.

Colman RW, Marder VJJ, Clowes AW. Overview of coagulation, fibrinolysis and their regulation. In: Colman RW, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ, Marder VJ, editors. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins; 2006:17-20.

Condra C, Nutt E, Petroski CJ, Simpson E, Friedman PA, Jacobs JW. Isolation and structural characterization of a potent inhibitor of coagulation factor Xa from the leech *Haementeria ghilianii*. *Thromb Haemost*. 1989;61:437-41.

Connolly TM, Jacobs JW, Condra C. An inhibitor of collagen-stimulated platelet activation from the salivary glands of the *Haementeria officinalis* leech. I. Identification, isolation, and characterization. *J Biol Chem*. 1992;267(10):6893-8.

Cotran RS, Mitchel RN. Distúrbios hemodinâmicos, trombose e choque. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins: patologia estrutural e funcional*. 6^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (NY)*. 1993;11(8):905-10.

Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*. 2000;16(1):23-52.

Croq F, Vizioli J, Tuzova M, Tahtouh M, Sautiere PE, Van Camp C, Salzet M, Cruikshank WW, Pestel J, Lefebvre C. A homologous form of human interleukin 16 is implicated in microglia recruitment following nervous system injury in leech *Hirudo medicinalis*. *Glia*. 2010;58(14):1649-62.

Daly R, Hearn MT. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*. 2005;18(2):119-38.

Damaso MC, Almeida MS, Kurtenbach E, Martins OB, Pereira N Jr, Andrade CM, Albano RM. Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(10):6064-72.

De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Broos K, Salles II, Deckmyn H. Antiplatelet drugs. *Br J Haematol.* 2008;142(4):515-28.

Depraetere H, Kerekes A, Deckmyn H. The collagen-binding leech products rLAPP and calin prevent both von Willebrand factor and alpha2beta1(GPIIb/IIIa)-I-domain binding to collagen in a different manner. *Thromb Haemost.* 1999;82(3):1160-3.

Drouet L, Bal dit Sollier C, Henry P. The basis of platelets: platelets and atherothrombosis: an understanding of the lack of efficacy of aspirin in peripheral arterial disease (PAD) and diabetic patients. *Drugs.* 2010;70:9-14.

Electricwala A, Sawyer RT, Jones CP, Atkinson T. Isolation of thrombin inhibitor from the leech *Hirudinaria manillensis*. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1991; 2(1):83-9.

Eser M, Masip L, Kadokura H, Georgiou G, Beckwith J. Disulfide bond formation by exported glutaredoxin indicates glutathione's presence in the *E. coli* periplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(5):1572-7.

Faria F. Inibidor de fator Xa da coagulação sanguínea (lefaxin) extraído do "complexo salivar" de sanguessugas *Haementeria depressa* (Ringuelet, 1972: Purificação, mecanismo de ação e seqüenciamento. [dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1999.

Faria F, Kelen EMA, Sampaio CAM, Bon C, Duval N, Chudzinski-Tavassi, AM. A new factor Xa Inhibitor (Lefaxin) from the *Haementeria depressa* leech. *Thromb. Haemost.* 1999;82:1469-73.

Faria F. Análise transcricional dos complexos salivares de sanguessugas *Haementeria depressa* através da geração de expressed sequence tags (ESTs) e Estudos cinéticos sobre o lefaxin. [tese (Doutorado em Biologia Molecular)]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2004.

Faria F, Junqueira de Azevedo IL, Ho PL, Sampaio UM, Chudzinski-Tavassi AM. Gene expression in the salivary complexes from *Haementeria depressa* leech through the generation of expressed sequence tags (ESTs). *Gene* 2005;349:173-85.

Flaumenhaft, R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(7):1152-60.

Gallin JI, Snyderman R. Inflammation: basis principles and clinical correlates. 3^a ed. Lippincott: Williams & Wilkin; 1999:79.

Garcia-Navarro CEK. Manual de hematologia veterinária. 2ª ed. São Paulo: Varela; 2005.

Gregg D, Glodschimidt-Clermont P. Platelets and cardiovascular disease. *Circulation*. 2003;188:88-90.

Grinna LS, Tschopp JF. Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast*. 1989;5(2):107-15.

Gurkan C, Ellar DJ. Recombinant production of bacterial toxins and their derivatives in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*. 2005;4:33.

Hamilton JR. Protease-activated receptors as targets for antiplatelet therapy. *Blood Rev*. 2009;23(2):61-5.

Hartwing, JH. Platelet structure. In: Michelson AD. *Platelets*. California: Academic Press. 2002: 37-45.

Hemler ME, Crouse C, Takada Y, Sonnenberg A. Multiple very late antigen (VLA) heterodimers on platelets. Evidence for distinct VLA-2, VLA-5 (fibronectin receptor), and VLA-6 structures. *J Biol Chem*. 1988;263(16):7660-5.

Hemler ME, Jacobson JG, Strominger JL. Biochemical characterization of VLA-1 and VLA-2. Cell surface heterodimers on activated T cells. *J Biol Chem*. 1985;260(28):15246-52.

Hickey MJ, Williams SA, Roth GJ. Human platelet glycoprotein IX: an adhesive prototype of leucine-rich glycoproteins with flank-center-flank structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(17):6773-7.

Higgins DR, Cregg JM. Introduction to *Pichia pastoris*. *Methods Mol Biol*. 1998; 103:1-15.

Hoffman M, Monroe DM. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007;21(1):1-11.

Hohenblum H, Gasser B, Maurer M, Borth N, Mattanovich D. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*. 2004;85(4):367-75.

Hong SJ, Kang KW. Purification of granulatin-like polypeptide from the blood-sucking leech, *Hirudo nipponia*. *Protein Expr Purif*. 1999;16(2):340-6.

Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, Cerutti L, De Castro E, Langendijk –Genevaux PS, Pagni M, Sigrist CJA. The PROSITE database. *Nucleic Acids Research*. 2006;34:227-30.

Innis MA. Glycosylation of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology*. 1989;13:233-46.

Invitrogen. pPIC9K: A *Pichia* vector for multicopy Integration and secreted expression. Version F, EUA, 2008.

Jackson SP, Mistry N, Yuan Y. Platelets and the injured vessel wall-- "rolling into action": focus on glycoprotein Ib/V/IX and the platelet cytoskeleton. *Trends Cardiovasc Med*. 2000;10(5):192-7.

Jung HI, Kim SI, Ha KS, Joe CO, Kang KW. Isolation and characterization of guamerin, a new human leukocyte elastase inhibitor from *Hirudo nipponia*. *J Biol Chem*. 1995;270(23):13879-84.

Junqueira de Azevedo IL, Farsky SH, Oliveira ML, Ho PL. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. *J Biol Chem*. 2001;276(43):39836-42.

Kamata T, Takada Y. Direct binding of collagen to the I domain of integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2, CD49b/CD29) in a divalent cation-independent manner. *J Biol Chem*. 1994;269(42):26006-10.

Kamiguti AS. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon*. 2005;45(8):1041-9.

Kingsman SM, Kingsman AJ. *Genetic Engineering*. Oxford: Blackweel Scientific Plublication; 1998.

Keller PM, Schultz LD, Condra C, Karczewshi J, Connolly TM. An inhibitor of collagen-stimulated platelet activation from the salivary glands of the *Haementeria officinalis* leech. II. Cloning of the cDNA and expression. *J Biol Chem*. 1992;267(10):6899-904.

Kim DR, Hong SJ, Ha KS, Joe CO, Kang KW. A cysteine-rich serine protease inhibitor (Guamerin II) from the non-blood sucking leech *Whitmania edentula*: biochemical characterization and amino acid sequence analysis. *J Enzyme Inhib*. 1996;10(2):81-91.

Kim DR, Kang KW. Amino acid sequence of piguamerin, an antistatin-type protease inhibitor from the blood sucking leech *Hirudo nipponia*. *Eur J Biochem*. 1998;254(3):692-7.

Kobe B, Deisenhofer J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci.* 1994;19(10):415-21.

Koh CY, Kini RM. Molecular diversity of anticoagulants from haematophagous animals. *Thromb Haemost.* 2009;102(3):437-53.

Krejci K, Fritz H. Structural homology of a trypsin-plasmin inhibitor from leeches (bdelin B-3) with secretory trypsin inhibitors from mammals. *FEBS Lett.* 1976;64(1):152-5.

Krezel AM, Ulmer JS, Wagner G, Lazarus RA. Recombinant decorsin: dynamics of the RGD recognition site. *Protein Sci.* 2000;9(8):1428-38.

Kössler J, Steigerwald U, Walter U. Anticoagulants of primary haemostasis. *Hamostaseologie.* 2009;29(3):274-8.

Kumar A, Herrmann HC. Tirofiban: an investigational platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist. *Expert Opin Investig Drugs.* 1997;6(9):1257-67.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T. *Nature.* 1970;227:680-5.

Langer HF, Gawaz M. Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. *Thrombosis and Haemostasis.* 2008;99:480-6.

Lederberg EM, Cohen SN. Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol.* 1974;119(3):1072-4.

Ledizet M, Harrison LM, Koskia RA, Cappello M. Discovery and pre-clinical development of antithrombotics from hematophagous invertebrates. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents.* 2005;3(1):1-10.

López JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome. *Blood.* 1998;91(12):4397-418.

Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.* 2005;22(4):249-70.

Mann KG. Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost.* 1999;82(2):165-74.

Markwardt F. Isolation and chemical characterization of hirudin. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1957;308(2-4):147-56,.

Max, Heiman. Online software for restriction mapping nucleotide sequences. Available from: <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>. [2008 Jul 17].

Mazur P, Henzel WJ, Seymour JL, Lazarus RA. Ornatin: potent glycoprotein IIb-IIIa antagonists and platelet aggregation inhibitors from the leech *Placobdella ornata*. *Eur J Biochem*. 1991;202(3):1073-82.

Mezei LM, Storts DR. Purification of PCR products in: *PCR technology: current innovation*. Griffin HG, Griffin AD. CRC-Press, Florida: Editora; 1994.

Michelson AD, Benoit SE, Furman MI, Barnard MR, Nurden P, Nurden AT. The platelet surface expression of glycoprotein V is regulated by two independent mechanisms: proteolysis and a reversible cytoskeletal-mediated redistribution to the surface-connected canalicular system. *Blood*. 1996;87(4):1396-408.

Michelson AD, Furman MI. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Curr Opin Hematol*. 1999;6(5):342-8.

Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest*. 1989;84(5):1440-5.

Morrissey JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem*. 1981;117(2):307-10.

Morrison DA. Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells. *J Bacteriol*. 1997;132(1):349-51.

Moser M, Auerswald E, Mentele R, Eckerskorn C, Fritz H, Fink E. Bdellastasin, a serine protease inhibitor of the antistasin family from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*)--primary structure, expression in yeast, and characterisation of native and recombinant inhibitor. *Eur J Biochem*. 1998;253(1):212-20.

Munro R, Jones CP, Sawyer RT. Calin -a platelet adhesion inhibitor from the saliva of the medicinal leech. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1991;2(1):179-84.

Nachman RL, Ferris B. Studies on the proteins of human platelet membranes. *J Biol Chem*. 1972;247:4468-75.

Neves FO, Ho PL, Raw I, Pereira CA, Moreira C, Nascimento AL. Overexpression of a synthetic gene encoding human alpha interferon in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2004;35(2):353-9.

Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. 2003;102(2):449-61.

Nurden AT, Caen JP. Specific roles for platelet surface glycoproteins in platelet function. *Nature*. 1975;255:720-2.

Nurden AT. Human platelet membrane glycoproteins. In: Bloom AL, Forbes CB, Thomas DP, Tuddenham EGD, editors. *Thrombosis and Haemostasis*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994:115-61.

Phillips DR. Effect of trypsin on the exposed polypeptides and glycoproteins in the human platelet membrane. *Biochemistry*. 1972;11:4582-8.

Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood*. 1988;71(4):831-43.

Pischel KD, Bluestein HG, Woods VL Jr. Platelet glycoproteins Ia, Ic, and IIa are physicochemically indistinguishable from the very late activation antigens adhesion-related proteins of lymphocytes and other cell types. *J Clin Invest*. 1988;81(2):505-13.

Porres JM, Benito MJ, Lei XG. Functional expression of keratinase (kerA) gene from *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris*. *Biootechnol Lett*. 2002;24:631-6.

Promega. pGEM®11Zf (+) Vector: Instructions for user of product P2411. Technical Bulletin. Oct 2006.

Ramos CR, Vilar MM, Nascimento AL, Ho PL, Thaumaturgo N, Edelenyi R, Almeida M, Dias WO, Diogo CM, Tendler M. r-Sm14 - pRSETA efficacy in experimental animals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96:131-5.

Ratner M. Protein expression in yeast. *Biotechnology*. 1989;7(11):1129-33.

Reis CV, Andrade SA, Ramos OH, Ramos CR, Ho PL, Batista IF, Chudzinski-Tavassi AM. Lopap, um ativador de protrombina de *Lonomia obliqua* pertencentes à família lipocalin: produção recombinante, caracterização bioquímica e estrutura-função de idéias. *Biochem J*. 2006;398(2):295-302.

Ribeiro JM. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis*. 1995;4(3):143-52.

Ricci-da-Silva ME, Kono K, Faria F, Radis-Baptista G, Yamane T, Chudzinski-Tavassi AM. Protein mapping of the salivary complex from a hematophagous leech. *OMICS*. 2005;9(2):194-208.

Romanos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level expression. *Curr Opin Biotech*. 1995;6:527-33.

Roth GJ. Developing relationships: arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucine-rich glycoproteins. *Blood*. 1991;77(1):5-19.

Ruggeri ZM. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Prog Hemost Thromb.* 1991;10:35-68.

Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res.* 2007;100(12):1673-85.

Ruppert EE, Barnes, Robert D. *Zoologia dos invertebrados.* 6ª ed. São Paulo: Editora Roca; 1996.

Saelman EU, Kehrel B, Hese KM, de Groot PG, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK. Platelet adhesion to collagen and endothelial cell matrix under flow conditions is not dependent on platelet glycoprotein IV. *Blood.* 1994a;83(11):3240-4.

Saelman EU, Nieuwenhuis HK, Hese KM, de Groot PG, Heijnen HF, Sage EH, Williams S, McKeown L, Gralnick HR, Sixma JJ. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood.* 1994b;83(5):1244-50.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985;230(4732):1350-4.

Salzet M. Anticoagulants and inhibitors of platelet aggregation derived from leeches. *FEBS Letters.* 2001;492:187-92.

Salzet M, Chopin V, Baert J, Matias I, Malecha J. Theromin, a novel leech thrombin inhibitor. *J Biol Chem.* 2000;275(40):30774-80.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989;3:B21.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.

Santoro SA. Platelet surface collagen receptor polymorphisms: variable receptor expression and thrombotic/hemorrhagic risk. *Blood.* 1999;93(11):3575-7.

Schaffer LW, Davidson JT, Siegl PK, Gould RJ, Nutt RF, Brady SF, Connolly TM. Recombinant leech antiplatelet protein prevents collagen-mediated platelet aggregation but not collagen graft thrombosis in baboons. *Arterioscler Thromb.* 1993;13(11):1593-601.

Schulze, H.; Shivdasani, R. A. Mechanisms of thrombopoiesis. *J Thromb Haemost.* 2005;3(8):1717-24.

Schmidt FR. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;65(4):363-72.

Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood.* 1987;70(1):307-15.

Sixma JJ, van Zanten GH, Huizinga EG, van der Plas RM, Verkley M, Wu YP, Gros P, de Groot PG. Platelet adhesion to collagen: an update. *Thromb Haemost.* 1997;78(1):434-8.

Söllner C, Mentele R, Eckerskorn C, Fritz H, Sommerhoff CP. Isolation and characterization of hirustasin, an antistatin-type serine-proteinase inhibitor from the medical leech *Hirudo medicinalis*. *Eur J Biochem.* 1994;219(3):937-43.

Sommerhoff CP, Söllner C, Mentele R, Piechottka GP, Auerswald EA, Fritz H. A Kazal-type inhibitor of human mast cell tryptase: isolation from the medical leech *Hirudo medicinalis*, characterization, and sequence analysis. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1994;375(10):685-94.

Steiner V, Knecht R, Börnsen KO, Gassmann E, Stone SR, Raschdorf F, Schlaeppi JM, Maschler R. Primary structure and function of novel O-glycosylated hirudins from the leech *Hirudinaria manillensis*. *Biochemistry.* 1992;31:2294-8.

Storer TI, Usinger RL, Stebbins RC, Nybakken, JW. *Zoologia Geral | tradução Francisco Azevedo de Arruda Sampaio.* 6ª ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional; 2003.

Stoscheck CM. Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 1990;182:50-68.

Strube KH, Kröger B, Bialojan S, Otte M, Dodt J. Isolation, sequence analysis, and cloning of haemadin. An anticoagulant peptide from the Indian leech. *J Biol Chem.* 1993;268(12):8590-5.

Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S, Kanaji K, Uchino H. A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood.* 1987;69(6):1712-20.

Surin WR, Barthwal MK, Dikshit M. Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis. *Thromb Res.* 2008;122(6):786-803.

Swadesh JK, Huang IY, Budzynski AZ. Purification and characterization of hementin, a fibrinogenolytic protease from the leech *Haementeria ghilianii*. *J Chromatogr.* 1990;502(2):359-69.

Swartz JR. Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol.* 2001;12(2):195-201.

Tan S, Wu W, Liu J, Kong Y, Pu Y, Yuan R. Efficient expression and secretion of recombinant hirudin III in *E. coli* using the L-asparaginase II signal sequence. *Protein Expr Purif.* 2002;25(3):430-6.

Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;72(2):211-22.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350-4.

Tuszynski GP, Gasic TB, Gasic GJ. Isolation and characterization of antistasin an inhibitor of metastasis and coagulation. *J. Biol. Chem.* 1987;262:9718-23.

Valentin N, Newman PJ. Human platelet alloantigens. *Curr Opin Hematol.* 1994;1(5):381-7.

Van Zanten GH, Connolly TM, Schiphorst ME, de Graaf S, Slootweg PJ, Sixma JJ. Recombinant leech antiplatelet protein specifically blocks platelet deposition on collagen surfaces under flow conditions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(9):1424-31.

Vanhoorelbeke K, Ulrichs H, Schoolmeester A, Deckmyn H. Inhibition of platelet adhesion to collagen as a new target for antithrombotic drugs. *Current Drug Targets. Cardiovascular & Haematological Disorders.* 2003;3:125-40.

Vaz RS, Prado MRM, Carvalho F. Biotecnologia na Industria Farmaceutica. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.* 2007;37:36-9.

Venturinelli ML, Hovnan A, Soeiro AM, Nicolau JC, Ramires JAF, D'Amico EA, Júnior CVS. Ativação plaquetária em formas clínicas distintas da doença arterial coronariana (papel da P-selectina e de outros marcadores nas anginas estável e instável). *Arq Bras Cardiol.* 2006;87(4):446-50.

Verkleij MW, Morton LF, Knight CG, de Groot PG, Barnes MJ, Sixma JJ. Simple collagen-like peptides support platelet adhesion under static but not under flow conditions: interaction via alpha2 beta1 and von Willebrand factor with specific sequences in native collagen is a requirement to resist shear forces. *Blood.* 1998;91(10):3808-16.

Vermylen J. Physiology of haemostasis. In: Gaetano G. and Garattinis S, editors. *Platelets: a multidisciplinary approach.* New York: Raven Press; 1978:1-3.

Verrastro T, Aires MM. Fisiologia. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

Villee CA, Walker Jr WF, Barnes RD. Zoologia Geral. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988.

Yin, J.; Guangxing Lib, Xiaofeng Rena, Georg Herrlerc. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*. 2007;127(3):335-47.

Walsh G. Biopharmaceuticals and biotechnology medicines: an issue of nomenclature. *Eur J Pharm Sci*. 2002;15(2):135-8.

Wardrop D, Keeling D. The story of the discovery of heparin and warfarin. *Br J Haematol*. 2008;141(6):757-63.

Ware J, Ruggeri ZM. Platelet adhesion receptors and their participation in hemostasis and thrombosis. *Drugs Today (Barc)*. 2001;37(4):265-74.

Warkentin TE, Powling MJ, Hardisty RM. Measurement of fibrinogen binding to platelets in whole blood by flow cytometry: a micromethod for the detection of platelet activation. *Br J Haematol*. 1990;76(3):387-94.

Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*. 1969;244(16):4406-12.

Wessel D, Flügge UI. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*. 1984;138(1):141-3.