

José Max Barbosa de Oliveira Junior
Lenize Batista Calvão
(Organizadores)



**As Ciências
Biológicas e a
Construção de
Novos Paradigmas
de Conhecimento**

José Max Barbosa de Oliveira Junior
Lenize Batista Calvão
(Organizadores)

As Ciências Biológicas e a Construção de Novos Paradigmas de Conhecimento

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Executiva: Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Rafael Sandrini Filho
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof^a Dr^a Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof^a Dr^a Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof^a Dr^a Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof^a Dr^a Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof^a Dr^a Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof.^a Dr.^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Prof.ª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof.ª Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof.ª Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
C569	As ciências biológicas e a construção de novos paradigmas de conhecimento [recurso eletrônico] / Organizadores José Max Barbosa de Oliveira Junior, Lenize Batista Calvão. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-540-2 DOI 10.22533/at.ed.402191508 1. Biotecnologia. 2. Ciências biológicas – Pesquisa – Brasil. 3. Ecologia. I. Oliveira Junior, José Max Barbosa de. II. Calvão, Lenize Batista. CDD 660.6
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A obra “**As Ciências Biológicas e a Construção de Novos Paradigmas de Conhecimento**” consiste de uma série de livros de publicação da Atena Editora. Com nove capítulos o volume I apresenta uma vasta heterogeneidade de conceitos e aplicações nas áreas de Biotecnologia, Genética, Saúde humana, Educação bem como a importância das condições ambientais que as espécies estão inseridas. No cenário atual de mudanças ambientais correntes e avanços tecnológicos é extremamente importante o uso adequado de técnicas em cada área.

O E-Book foi dividido em nove capítulos que abordam estratégias didáticas usando práticas em campo para alunos da educação básica. As aplicações dessas práticas permitem os discentes observar por si próprios novos domínios do conhecimento incluindo áreas com conceitos complexos como em Ecologia. Esse avanço possibilita a longo prazo que os alunos sejam participativos nas decisões do meio em que vivem. O tema sobre Saúde humana se encontra em pauta trazendo os aspectos nutricionais de adolescentes com e sem Síndrome de Down. Discussões importantes como obesidade e baixa ingestão de fibras realizada pelos jovens devem ser elencados para uma educação alimentar desde os primeiros anos escolares.

As aplicações de técnicas adequadas de Biotecnologia são extremamente importantes para uso de produtos eficazes em diversas áreas. Adicionalmente, análises citogenéticas fornecem informações que são relevantes e direcionar um correto aconselhamento genético familiar. O livro também traz publicações que contribuí com avanços na área da medicina veterinária, através da avaliação macroscópica e microscópicamente de lesões cranioencefálicas de cães e gatos.

Por fim, atividades humanas como construção de reservatórios são cada vez mais frequentes em sistemas naturais, desta forma a avaliação das condições ambientais da variação espacial é muito importante para conservação das espécies. Os estudos apresentados aqui, em português e linguagem acessível, são de extrema relevância nas áreas destinadas a saúde humana, sociais, medicina veterinária e relação das espécies com ambiente englobando uma série de perguntas intrigantes e também compreensível a jovens cientistas.

Excelente leitura!

José Max Barbosa de Oliveira Junior

Lenize Batista Calvão

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
A BOTÂNICA COM FOCO NO OLHAR DE ESTUDANTES DO ENSINO MÉDIO DE UMA ESCOLA ESTADUAL DE COMODORO - MT	
Josefa Silva dos Santos Jucimar Silva dos Reis	
DOI 10.22533/at.ed.4021915081	
CAPÍTULO 2	11
ANÁLISE DA DIETA E ESTADO NUTRICIONAL DE CRIANÇAS COM SÍNDROME DE DOWN: ESTUDO DE CASO-CONTROLE	
Bruna Rongetta Torres Amanda Daniel Natalia Tonon Domingues Luiza Tavares Carneiro Santiago Cristina Helena Lima Delambert Bizzotto Carlos Alexandre Hattori Tiba Lidia Raquel De Carvalho Catia Regina Branco Da Fonseca	
DOI 10.22533/at.ed.4021915082	
CAPÍTULO 3	22
AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DAS FOLHAS DE <i>Piptadenia stipulacea</i>	
Geovanna Hachyra Facundo Guedes Bruno Mendes Tenorio José Anderson da Silva Gomes Letícia Simone Melo dos Santos Marcos Aurélio Santos da Costa Maria Luísa Figueira de Oliveira Matheus Carvalho Brito Leite Renatha Claudia Barros de Sobreira Tainá Maria Santos da Silva Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório Carolline Guimarães D'Assunção Cintia Giselle Martins Ferreira	
DOI 10.22533/at.ed.4021915083	
CAPÍTULO 4	31
AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA DE LESÕES CRANIOENCEFÁLICAS EM PEQUENOS ANIMAIS	
Barbara Wagner Duarte Ferraz de Camargo Tália Missen Tremori Selene Daniela Babboni Maria Jaqueline Mamprim Noeme Sousa Rocha	
DOI 10.22533/at.ed.4021915084	

CAPÍTULO 5	45
CRISPR/CAS9 COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO DO NICHOS ESPERMATOGONIAL DE ZEBRAFISH (<i>DANIO RERIO</i>)	
Matheus Morais Miranda	
Lucas Benites Doretto	
Rafael Henrique Nóbrega	
DOI 10.22533/at.ed.4021915085	
CAPÍTULO 6	59
PHYTOCHEMICAL STUDY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF <i>Anacardium occidentale</i> L. AND <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	
Sérvio Quesado Junior	
Márcia Maria Mendes Marques	
Ana Raquel Araújo da Silva	
Maria Izabel Florindo Guedes	
DOI 10.22533/at.ed.4021915086	
CAPÍTULO 7	69
LIMNOLOGIA COMPARADA DOS PRINCIPAIS TIPOS DE HABITATS DO RESERVATÓRIO DE ROSANA, RIO PARANAPANEMA (SP/PR)	
Rafaela Shizuko Yamashita Kimura	
João Felipe Denys Pereira	
Maria Luisa Passos Frigero	
Marco Aurélio Pessotto	
Pedro Vinícius Melo dos Santos	
Marcos Gomes Nogueira	
DOI 10.22533/at.ed.4021915087	
CAPÍTULO 8	81
OLIGOMERIZAÇÃO DO COMPLEXO FERRITINA-LIGANTE POR MEIO DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA FERRITINA DE <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	
Giovanna Tavares Jeronymo	
Ricardo Barros Mariutti	
Thaís Caroline Serafim	
DOI 10.22533/at.ed.4021915088	
CAPÍTULO 9	93
TRANSLOCAÇÃO BALANCEADA HERDADA T(8;19)(Q12;Q13)MAT CONCOMITANTE À DELEÇÃO DE 15Q11.2 EM UM PACIENTE COM SÍNDROME DE ANGELMAN (SA) - A CITOGENÉTICA CLÁSSICA NÃO EVANESCE	
Elenice Ferreira Bastos	
Carlos Roberto da Fonseca	
Patrícia Santana Correia	
Cristiane Queila Ebraim Barros	
Ingrid Bendas Feres Lima	
Anna Luiza Vaz Serrão	
Lúcia de Fátima Marques de Moraes	
Juan Clinton Llerena Jr	
DOI 10.22533/at.ed.4021915089	
SOBRE OS ORGANIZADORES	99
ÍNDICE REMISSIVO	99

OLIGOMERIZAÇÃO DO COMPLEXO FERRITINA-LIGANTE POR MEIO DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA FERRITINA DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Giovanna Tavares Jeronymo

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto – SP.

Ricardo Barros Mariutti

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto – SP.

Thaís Caroline Serafim

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto – SP.

RESUMO: As ferritinas são proteínas capazes de armazenar ferro, tornando este biodisponível para as células, além de sua importância na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio. Essas proteínas tem um papel imprescindível em vários aspectos relacionados à bionanotecnologia. Como exemplo disso, elas estão relacionadas à biomineralização, podendo mineralizar uma série de complexos metálicos, além da entrega de drogas no interior da cápside da proteína e do desenvolvimento de vacinas, um papel precursor que pode ser utilizado em aplicações farmacêuticas e terapêuticas. Por conta das inúmeras aplicações da ferritina e pela dificuldade de purificação desta diretamente a partir de culturas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o

objetivo foi expressar e purificar a ferritina em *Escherichia coli* possibilitando a compreensão dos fatores que influenciam a oligomerização/desoligomerização do oligômero da ferritina para aplicação nas inúmeras áreas da bionanotecnologia. Esse procedimento foi realizado por meio da transformação bacteriana utilizando o vetor pET28a recombinante, subsequente expressão da proteína em larga escala e purificação em coluna de afinidade seguida de cromatografia de exclusão molecular. As proteínas purificadas foram utilizadas em ensaios de espalhamento dinâmico de luz (DLS) para testar as condições que influenciam na oligomerização/desoligomerização da ferritina. Em relação aos resultados, as condições testadas (pH, presença de ferro e EDTA) influenciaram o raio hidrodinâmico da proteína e isso pode estar relacionado a indução da auto-montagem/desmontagem do oligômero. Enquanto a presença de ferro induziu a auto-montagem do oligômero, a diminuição do pH e adição de EDTA induziram sua desoligomerização. **PALAVRAS-CHAVE:** ferritina; oligômero; bionanotecnologia.

OLIGOMERIZATION OF THE FERRITIN-LIGAND COMPLEX BY THE EXPRESSION AND PURIFICATION OF THE FERRITIN OF

ABSTRACT: Ferritins are proteins capable of storing iron, making it bioavailable to cells, in addition to its importance in the detoxification of reactive oxygen species. These proteins play an essential role in many aspects related to bionanotechnology. As an example, they are related to biomineralization, which can mineralize a series of metal complexes, as well as the delivery of drugs inside the protein capsid and the development of vaccines, a precursor role that can be used in pharmaceutical and therapeutic applications. Because of the innumerable applications of ferritin and the difficulty in purifying it directly from *Corynebacterium pseudotuberculosis*, the objective was to express and purify the ferritin in *Escherichia coli*, making possible the understanding of the factors that influence the oligomerization/desoligomerization of the ferritin oligomer for the application in the many areas of bionanotechnology. This procedure was performed by bacterial transformation using the recombinant pET28a vector, subsequent large scale protein expression and affinity column purification followed by molecular exclusion chromatography. Purified proteins were used in dynamic light scattering assays (DLS) to test conditions influencing ferritin oligomerization/desoligomerization. Regarding the results, the conditions tested (pH, presence of iron and EDTA) influenced the hydrodynamic radius of the protein and this may be related to the induction of self-assembly / disassembly of the oligomer. While the presence of iron induced self-assembly of the oligomer, the decrease in pH and addition of EDTA induced its desoligomerization.

KEYWORDS: ferritin; oligomer; bionanotechnology.

1 | INTRODUÇÃO

A ferritina é uma proteína codificada em genomas de uma gama enorme de organismos, desde Archaea até humanos e é expressa na maioria dos tipos celulares. Nas bactérias ela também está presente, sendo que muitas não utilizam apenas o ferro extracelular como fonte de ferro, mas depositam reservas intracelulares dentro das proteínas de armazenamento, sendo a ferritina uma das principais (ANDREWS, 1998). A ferritina arranja-se em um complexo protéico esférico formado por 24 subunidades (cada subunidade formada por um feixe de quatro α -hélices) dispostas em simetria octaédrica ao redor de uma cavidade central que atua no armazenamento de ferro. Existem canais no revestimento da proteína nos eixos de simetria: 8 canais triplos e 6 canais quádruplos, sendo uma via de acesso importante para Fe^{2+} na cavidade proteica (BRADLEY et al., 2014) (Figura 1).

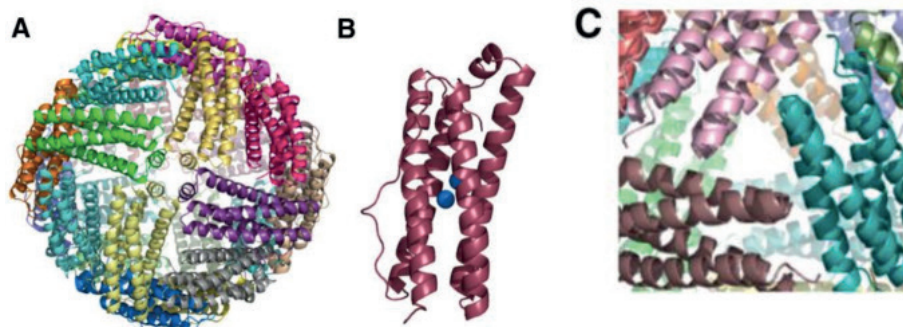


Figura 1. A) Representação esquemática de uma ferritina com 24 subunidades. B) Quatro estruturas de α -hélices conservadas da subunidade de ferritina, com a quinta hélice curta em C-terminal. C) Visão em close de um dos oito canais tripos do eixo de simetria.

As ferritinas dos vertebrados contêm pelo menos dois tipos de subunidades: cadeias pesada (H) e leve (L). Uma distinção importante entre as duas subunidades é que as cadeias H contêm resíduos que formam um sítio de ferro dinuclear que catalisa a oxidação de Fe^{+2} à Fe^{+3} (centro catalítico de ferroxidase). O aumento da ferritina rica em subunidades H está relacionado com a utilização de ferro pelo organismo, enquanto o aumento da subunidade L está relacionado ao depósito de ferro, sendo que a ferritina apresenta-se como uma flexível reserva de ferro no organismo (YANG et al., 1999). Entretanto, as ferritinas procarióticas parecem ser homopolímeros que consistem apenas em subunidades do tipo cadeia H, mas estas não são particularmente similares às ferritinas de cadeia H eucarióticas em termos de similaridade geral de sequência (identidade de 20%) (BRADLEY et al., 2014).

Nessas proteínas, a cavidade central atua no armazenamento de ferro, sendo que este é absorvido na forma ferrosa solúvel (Fe^{+2}), mas é depositado na forma férrica oxidada (Fe^{+3}). Esse processo de armazenamento de ferro requer um passo de ferroxidação, catalisado pelo centro de ferroxidase localizado na região central das subunidades. Os resíduos neste local são altamente conservados e atuam como ligantes para a ligação de dois íons ferrosos (TOSHA et al., 2010), o primeiro passo no processo de absorção de ferro. O par de íons ferrosos ligado é posteriormente oxidado por O_2 resultando na formação do ferro férrico e redução de O_2 à peróxido de hidrogênio (ANDREWS et al., 2003). Os íons férricos migram para o exterior do centro de ferroxidase, transferidos para a cavidade central e ocorre sua mineralização formando pequenos aglomerados de ferro (hidretos de ferro) (BOU-ABDALLAH et al., 2002) (Figura 2). O núcleo de ferro mineralizado atua para fornecer ferro biodisponível a uma variedade de enzimas redox e também atende um papel de desintoxicação.

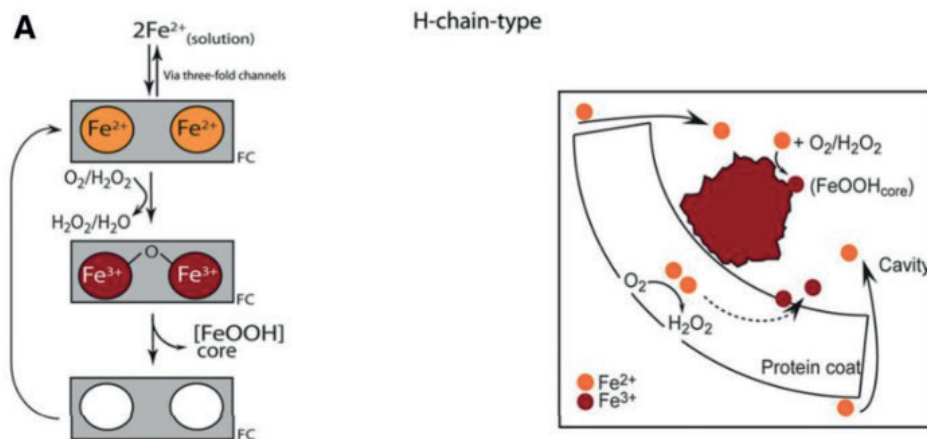


Figura 2. Mecanismo de mineralização das ferritinas do tipo cadeia-H, descrevendo o funcionamento do centro de ferroxidase.

Como as ferritinas são capazes de armazenar uma quantidade significativa de ferro dentro do seu núcleo oco, exibem estabilidade térmica e química notável, são passíveis de reconstituição através de desmontagem e de modificações químicas e biológicas, elas são alvos atraentes para a pesquisa em bionanotecnologia (MARLES-WRIGHT; HE, 2015). Algumas das suas aplicações bionanotecnológicas é a biomineralização. Na prática, a cápside da ferritina pode ser usada para mineralizar uma série de complexos metálicos. Esta exibe a capacidade de aceitar não apenas íons de ferro, mas também uma grande variedade de átomos, tornando-a um molde biocompatível perfeito para a síntese de nanopartículas controladas por tamanho e forma (SANO et al., 2005).

Outra aplicação é a entrega de medicamentos, na qual ocorre o carregamento da cavidade proteica com medicamentos contendo metal por meio da sua montagem e desmontagem em pH variados (MARLES-WRIGHT; HE, 2015). Ao combinar o carregamento da ferritina com fármacos e a modificação da sua superfície com epítopos de peptídeos, a ferritina pode ser direcionada especificamente para tumores de células particulares para a administração eficiente de agentes terapêuticos. Outro ponto importante é o desenvolvimento de vacinas, que ocorre por meio da ligação da ferritina à proteínas virais, por exemplo, proteínas do envelope de vírus patogênicos, sendo que essas proteínas de fusão são usadas no desenvolvimento de anticorpos contra os vírus. Um aspecto funcional dessas vacinas é que a proteína viral pode ser posicionada no interior da ferritina, assim a cápside não irá ser reconhecida como estranha pelo organismo até que comece a se desmontar e o antígeno se torne exposto (CARTER; LI, 2006). Isso significa que é possível criar um efeito antigênico que pode potencialmente produzir uma imunidade maior, pois a exposição aos antígenos continuará por um período de tempo muito mais longo.

2 | OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi expressar a ferritina de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em *E. coli*, realizar sua purificação e avaliar os fatores e condições que influenciam a oligomerização/desoligomerização do oligômero da ferritina, visando compreender o mecanismo de montagem e desmontagem da sua cápside para aplicação nas mais diversas áreas da bionanotecnologia. Para isso foram utilizadas técnicas de biologia molecular e análises biofísicas.

3 | JUSTIFICATIVA

Devido à dificuldade de purificação de proteínas bacterianas diretamente a partir de culturas de *C. pseudotuberculosis*, a expressão da ferritina em *E. coli* viabiliza a produção em larga escala desse alvo para estudos de interação e estruturais. Além disso, o conhecimento do mecanismo de oligomerização da ferritina permitirá no futuro, servir como base no desenvolvimento de complexos ferritina-ligante com aplicações na pecuária, medicina e agricultura, podendo ser utilizados para fabricação de nanopartículas metálicas, entrega de medicamentos, desenvolvimento de vacinas e muitas outras utilizações. Portanto, o entendimento sobre as modificações químicas, físicas e biológicas que influenciam o mecanismo de desmontagem e reconstituição da cápside da ferritina é essencial para avanços na área de bionanotecnologia.

4 | METODOLOGIA

Os vetores de expressão contendo as sequências nucleotídicas codificadoras da ferritina de *C. pseudotuberculosis* foram sintetizados pela empresa GenScript. O vetor utilizado foi o pET28a recombinante, o qual possui uma sequência codificadora de uma cauda de seis resíduos de histidina fusionada à proteína expressa. Primeiramente, foi realizada a transformação bacteriana, na qual 80 ng de plasmídeos recombinantes foram adicionados a 50 µL de solução contendo linhagens de *E. coli* competentes (BL21 RIL e BL21 T1). Essa mistura permaneceu no gelo durante 30 minutos, e então, foi submetida ao choque de temperatura a 42 °C por 1 minuto seguida de 2 minutos no gelo. Após o choque térmico foram adicionados 450 microlitros de meio de cultura LB (Luria Bertani) líquido pré-aquecido e 20 mM de MgCl₂, sendo mantido sob agitação (1 hora a 37°C a 250 rpm).

Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em meio sólido seletivo LB contendo canamicina, para selecionar apenas os microrganismos que sofreram o processo de transformação bacteriana. As colônias resistentes foram inoculadas em tubos individuais contendo 10 mL de meio líquido LB com mesmo antibiótico (pré-inóculo), mantidos sob agitação e aeração constante e então, utilizados para expressão em pequena escala para determinar as melhores condições de expressão (variações

na linhagem celular, temperatura de indução, quantidade de indutor e tempo de expressão). A proteína foi expressa adicionando 10 mL de pré-inóculo em 1L de meio seletivo LB com 10 microlitros de canamicina, o qual foi mantido no shaker até atingir a densidade ótica entre 0,4 e 0,6 para indução da expressão com IPTG. Após aproximadamente 2 horas, a cultura foi induzida com IPTG a 0,3 mM.

Após 5 horas de expressão a cultura foi centrifugada por 15 minutos à 5000 x g à 5°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspendido em tampão de lise celular (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 500 mM, Glicerol 10%, 10mM de imidazol, pH 7.8). A solução foi submetida à sonicação em sonicador (Marconi - MA 103) para lise celular. O lisado celular obtido desse processo foi centrifugado à 15000 x g por 40 minutos, à 5°C. Posteriormente, a purificação foi feita em coluna de afinidade utilizando resina de níquel (Ni-NTA). O sobrenadante do lisado celular obtido após centrifugação foi passado através da coluna de purificação (coluna de gravidade, Bio-Rad) para que as proteínas (His-tagged) fossem adsorvidas ao níquel. Após a adsorção, a resina foi lavada utilizando tampão de lavagem (50mM NaH_2PO_4 , 500mM NaCl e 10 % glicerol, pH 7.7) com quantidades crescentes de imidazol para remover proteínas contaminantes adsorvidas inespecificamente na resina de níquel. Por fim, a proteína de interesse contendo a His-tagged foi eluída utilizando tampão de eluição (20 mM fosfato de sódio dibásico, 300 mM NaCl, 400 mM imidazol, pH 7.7).

As proteínas da fração eluída foram concentradas até 500 μL em filtros de centrífuga Amicon® Ultra-15. Posteriormente foram submetidas a um novo processo de purificação por cromatografia de exclusão molecular utilizando coluna Superdex G75 10/300 em Akta purifier com um tampão 10 mM de Tris HCl e 100 mM de NaCl, com 10% de glicerol em um pH 7 com a intenção de aumentar a pureza e melhorar a qualidade da amostra proteica. Posteriormente, foi realizada a remoção da cauda de histidina pela enzima TEV protease, na qual a proteína recombinante e a TEV protease foram incubadas em uma membrana de diálise, a qual foi mantida em um tampão Tris HCl 10 mM NaCl 100 mM (pH=7). Após a incubação, a solução contendo a proteína clivada e a TEV protease foi novamente submetida à cromatografia de afinidade, utilizando resina à base de níquel (repurificação por afinidade).

Após todas as etapas foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida com detergente SDS (SDS-PAGE), que possibilita a separação de proteínas de acordo com o tamanho molecular para análise de pureza. Para determinar a presença da proteína com altíssima sensibilidade também foi realizado o Western Blot. Nesta técnica, foi utilizado um anticorpo primário (presente no antissoro monoclonal Antipoli-histidina) que interage especificamente com a cauda de histidina da proteína recombinante. Em seguida, o anticorpo secundário (presente no antissoro anti-IgG), se acopla ao primário, sendo responsável pela sua sinalização. É possível observar a coloração azul-púrpura apenas quando ocorre a reação antígeno/anticorpo, ou seja, na presença da proteína.

Foram realizados ensaio de DLS (espalhamento dinâmico de luz), no qual a solução proteica foi centrifugada por 10 minutos à 16000 x g à 4°C, e as amostras foram transferidas para cubetas de quartzo para análise no aparelho Zetasizer Nano ZS90 (Malvern). Foram testadas diversas condições como presença de EDTA no tampão, alteração do pH e adição de cloreto ferroso (FeCl₂) visando concluir se esses fatores influenciavam no raio hidrodinâmico (RH) da proteína, e consequentemente na montagem e desmontagem do oligômero da ferritina.

5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da análise da intensidade das bandas do gel SDS-PAGE, concluiu-se que o melhor rendimento na expressão da proteína alvo foi utilizando a linhagem BL21-T1 em 1 L de meio LB na presença do indutor IPTG a 0,3 mM em temperatura de 30°C por 5 horas. Durante a primeira etapa de purificação por cromatografia de afinidade, foi visto que a ferritina era liberada durante a lavagem com tampão de eluição. Foi necessário realizar a cromatografia de exclusão molecular, a qual garantiu um maior grau de pureza da amostra pela separação da proteína alvo das contaminantes pelo seu tamanho (Figura 3). Por meio do Western Blot foi possível a detecção da presença da ferritina com um maior grau de sensibilidade pela reação antígeno-anticorpo (Figura 4).

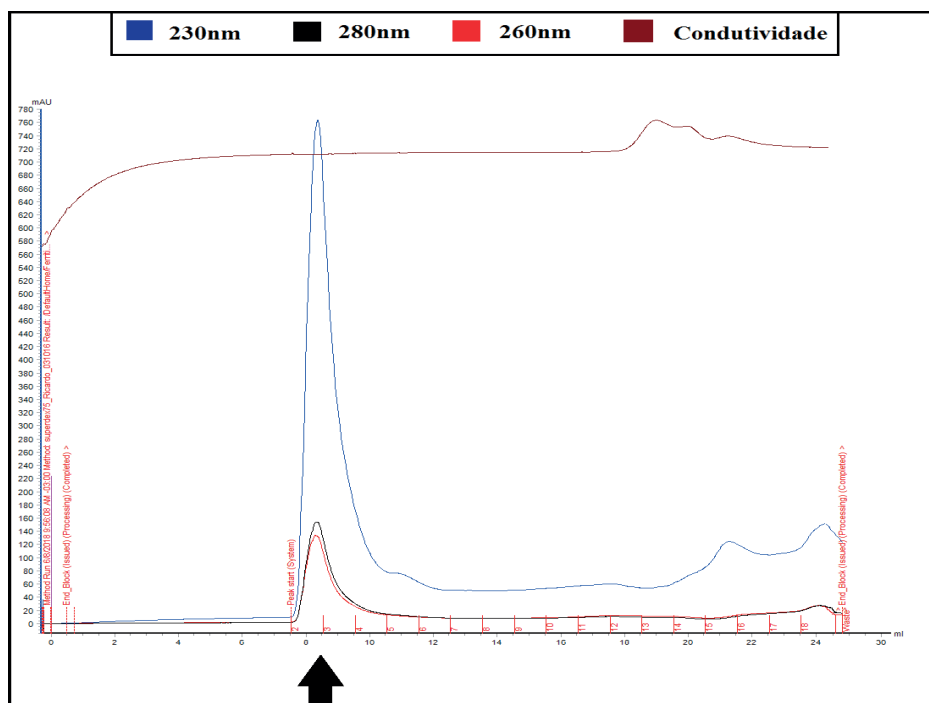


Figura 3. Perfil de cromatografia de exclusão molecular da ferritina de *C. pseudotuberculosis* concentrada e aplicada em Superdex G75/300 (GE), após etapa de purificação a partir da coluna de níquel.

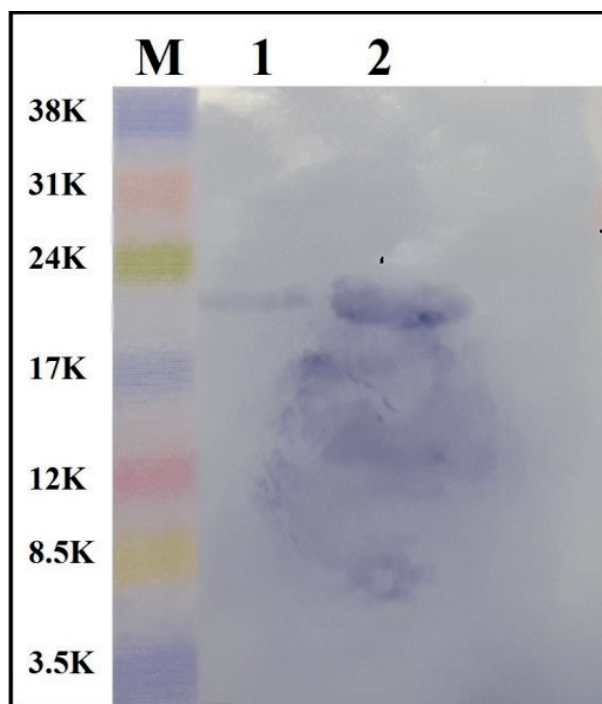


Figura 4. Resultado do *Western blot* evidenciando a reação específica do anticorpo Antipoli-histidina, para detecção da ferritina de *C. pseudotuberculosis*. **(M)** Marcador molecular pré-corado. **(1)** 5 μ L da ferritina linhagem BL21(DE3)-T1, 0,43mg/mL. **(2)** 15 μ L da ferritina linhagem BL21(DE3)-T1, 0,43mg/mL.

A clivagem da cauda de histidina ocorreu como o esperado, já que a proteína alvo antes da clivagem apresenta um tamanho em kDa maior que a proteína alvo após a clivagem (Figura 5). A repurificação por afinidade (Ni-NTA) também foi realizada com sucesso, sendo que a TEV protease e as proteínas contaminantes que possuíam muitos aminoácidos histidina ficaram aderidas ao níquel da resina, e a ferritina como não possuía mais a Histag foi eluída da resina com o tampão de lavagem contendo 60 mM de imidazol.

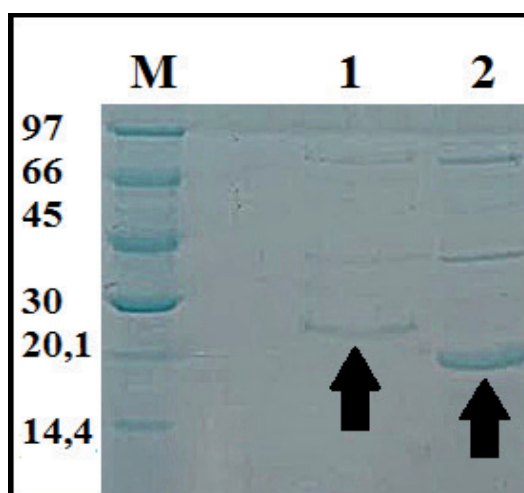


Figura 5. Gel SDS - PAGE 15% contendo a amostra antes e depois da remoção da Histag. **(M)** Marcador molecular em kDa. **(1)** Amostra de ferritina antes da clivagem. **(2)** 15 μ L da amostra de ferritina incubada com TEV protease. As setas pretas correspondem as bandas para comparação do tamanho em kDa da ferritina não clivada (1) e clivada com a TEV protease (2).

Por meio da utilização do espalhamento dinâmico de luz foram testadas diversas condições como variação de temperatura, concentração proteica, valores de pH, adição de diferentes metais e de compostos quelantes, que pudessem induzir ou reprimir a auto-montagem/desmontagem do oligômero da ferritina. A primeira condição testada foi a adição de EDTA no tampão 10 mM Tris 100 mM NaCl, sendo que o diâmetro hidrodinâmico da proteína foi reduzido de 70 nm para 10 nm. Posteriormente, foi adicionado 0,5 M de Cloreto ferroso (II) (FeCl_2) à essa solução, sendo que o diâmetro aumentou para 100 nm (Figura 6). Em relação ao EDTA, por ser um agente quelante, ou seja, tem a capacidade de complexar íons metálicos, pode estar sequestrando os íons de ferro da cavidade central induzindo sua desoligomerização, por isso houve redução do seu diâmetro. Na condição com FeCl_2 , ocorreu aumento do diâmetro pois a ferritina absorve o ferro disponível e o armazena, induzindo a auto-montagem do oligômero. Isso pode ser explicado por conta da ferroxidação que ocorre no interior das ferritinas. Essas proteínas absorvem ferro na forma ferrosa solúvel (Fe^{+2}), mas o ferro é depositado na cavidade central na forma férrica oxidada (Fe^{+3}).

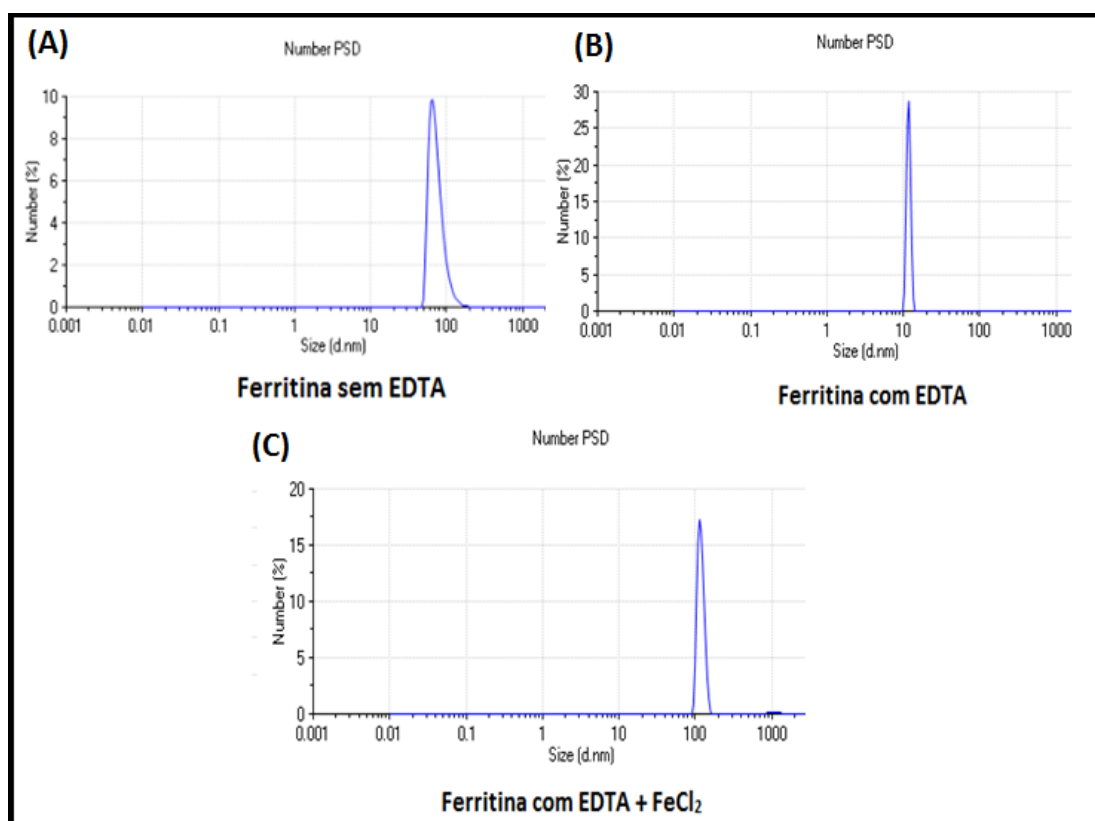


Figura 6. Gráfico do tamanho (nm) em relação ao número (%) plotado por meio de DLS demonstrando o efeito do EDTA e FeCl_2 sobre a ferritina. **(A)** Ferritina em tampão 10 mM Tris 100 mM NaCl sem EDTA, evidenciando seu Dh próximo a 70 nm. **(B)** Ferritina com 1mM de EDTA, evidenciando o seu Dh próximo de 10 nm. **(C)** Ferritina com 1mM de EDTA e 0,5M de Cloreto de Ferro (II) (FeCl_2), evidenciando seu Dh próximo de 100 nm.

As próximas condições testadas incluíram comparações do Dh da ferritina em diferentes pHs (tampão TRIS x tampão Glicina). Quando a proteína estava em

tampão 10 mM Tris 100 mM NaCl (pH=8) apresentou um Dh de 55 nm e quando estava em tampão 5 mM glicina (pH=2,5) o diâmetro diminuiu para 35 nm (Figura 7). Quando houve adição de 0,5 M de cloreto ferroso ao tampão 5 mM glicina (pH=2,5) o diâmetro aumentou de 35 para 55 nm (Figura 8), sendo que o mesmo ocorreu com o tampão 10 mM Tris 100 mM NaCl (pH=8), sendo que o diâmetro aumentou de 55 para 100 nm após a adição do ferro (Figura 9).

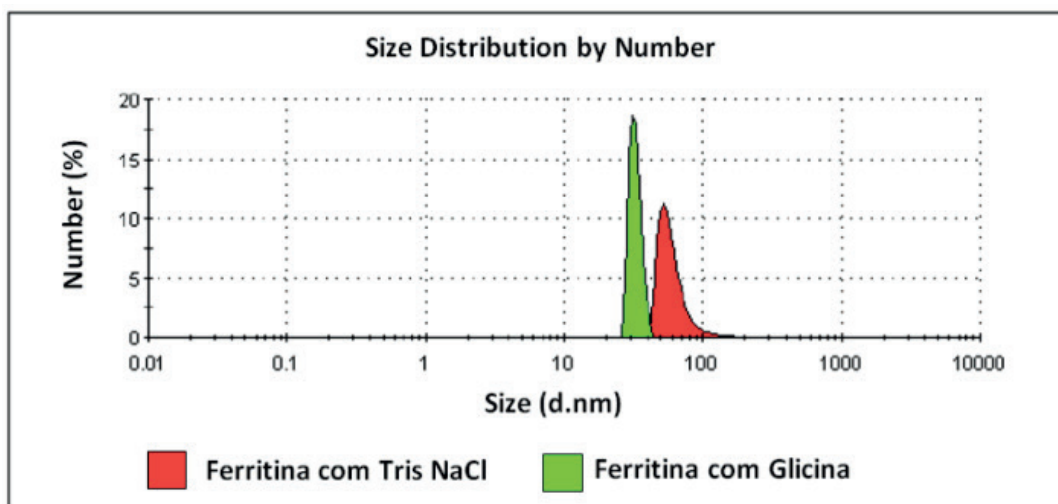


Figura 7. Gráfico do tamanho (nm) em relação ao número (%) plotado por meio de DLS, comparando a diferença do Dh da ferritina em 10 mM Tris 100 mM NaCl (pH=8) e em 5 mM de tampão glicina (pH=2,5).

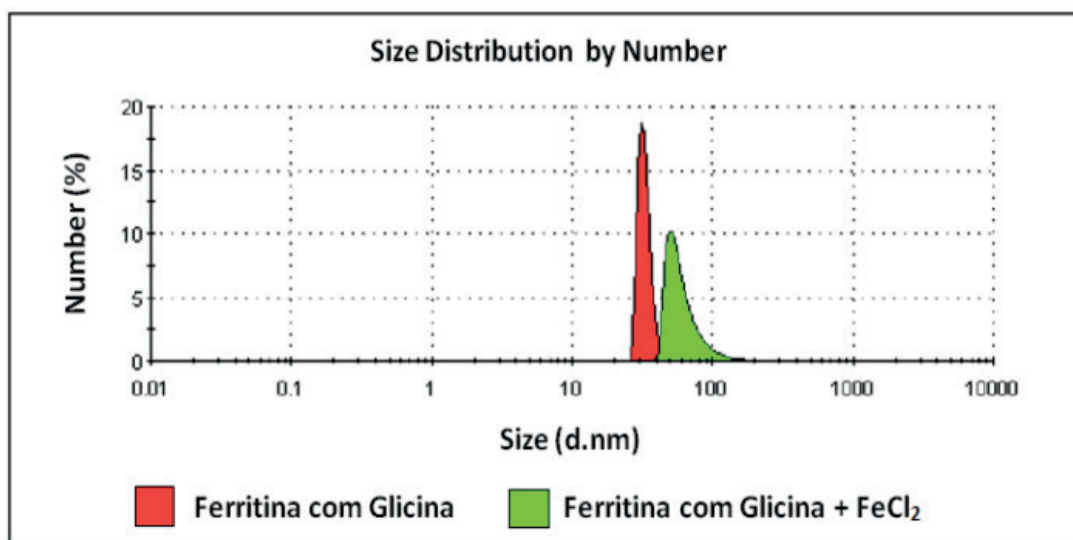


Figura 8. Gráfico do tamanho (nm) em relação ao número (%) plotado por meio de DLS, comparando a diferença do Dh da ferritina em 5 mM de tampão glicina (pH=2,5) e com 0,5 M de FeCl₂.

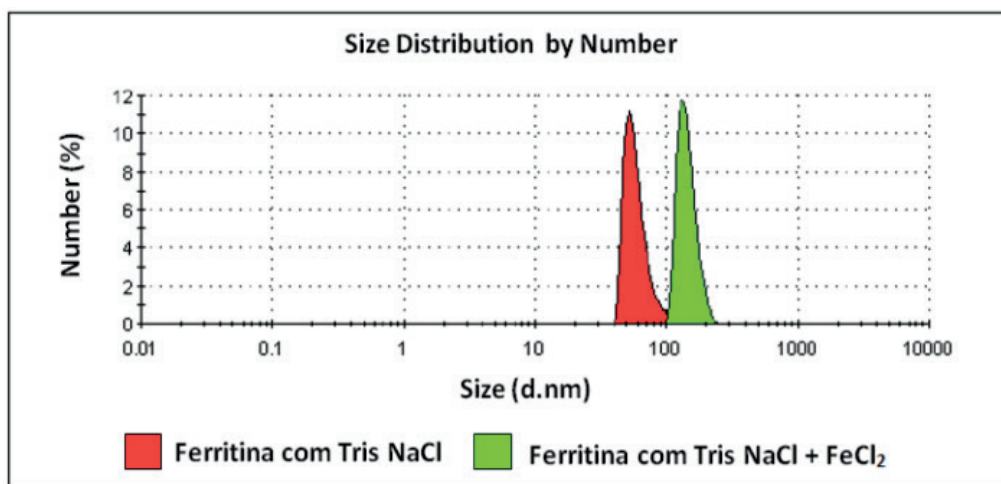


Figura 9. Gráfico do tamanho (nm) em relação ao número (%) plotado por meio de DLS, comparando a diferença do Dh da ferritina em 10 mM Tris 100 mM NaCl (pH=8) e com 0,5 M de FeCl₂.

Levando em conta esses resultados, a conclusão é que ao diminuir o valor do pH de 8 para 2,5 a proteína se torna instável, ocorrendo possivelmente sua desnaturação e a desmontagem do oligômero, indicado pela diminuição do valor do Dh em todas as condições em que houve a utilização do tampão glicina com pH 2,5. Mesmo sabendo que a cápside da ferritina composta por 24 subunidades exibe estabilidade térmica e química notável, o pH usado foi tão baixo que a estabilidade foi perdida. Em um trabalho realizado por Kim et al. (2011), foi analisada a estabilidade da apoferritina mediante mudanças no valor do pH, sendo que abaixo do pH 3,4 a apoferritina tornou-se instável e passou por desmontagens graduais através de vários intermediários estruturais. Foi comprovado também que mesmo em um pH muito baixo (2,5), a presença de ferro continua atuando na auto-montagem das subunidades da cápside da ferritina. Na condição em que o pH foi diminuído pelo tampão glicina ocorreu primeiramente a desmontagem do oligômero, que depois foi novamente montado por conta da absorção do FeCl₂.

6 | CONCLUSÃO

Os protocolos testados permitem expressar e purificar a ferritina de *C. pseudotuberculosis*. Os ensaios de espalhamento dinâmico de luz contribuíram para indicar as condições (pH, presença de ferro e EDTA) que influenciam no raio hidrodinâmico da amostra proteica e isso pode estar relacionado ao mecanismo de desmontagem e reconstituição do oligômero da ferritina, sendo imprescindível para avanços na área de bionanotecnologia como veículo de entrega de drogas, fabricação de nanopartículas metálicas, entre outros.

REFERÊNCIAS

ANDREWS, S.C. **Iron storage in bacteria.** *Adv. Microb. Phys.*, v. 40, p. 281–351, 1998.

ANDREWS, S.C.; ROBINSON, A.K.; RODRIGUEZ-QUINONES, F. **Bacterial iron homeostasis.** *FEMS Microbiology Reviews*, v. 27, p. 215–237, 2003.

BOU-ABDALLAH, F. et al. **Mu-1,2-Peroxo-bridged di-iron(III) dimer formation in human H-chain ferritin.** *Biochem J*, v. 364, p.57–63, 2002.

BRADLEY, J.M.; MOORE, G.R.; LE BRUN, N.E. **Mechanisms of iron mineralization in ferritins: one size does not fit all.** *J Biol Inorg Chem.*, v. 19, p. 775-785, 2014.

CARTER, D. C.; LI, C.Q. **Ferritin fusion proteins for use in vaccines and other applications.** New Century Pharmaceuticals Inc., US Pat. 7,097,841, p. 29, 2006.

KIM, M. et al. **pH-Dependent Structures of Ferritin and Apoferritin in Solution: Disassembly and Reassembly.** *Biomacromolecules*, v. 12, p. 1629–1640, 2011.

MARLES-WRIGHT, J.; HE, D. D. **Ferritin family proteins and their use in bionanotechnology.** *New Biotechnology.*, v. 32, i. 6, p. 651-657, 2015.

SANO, K. I. et al. **Endowing a ferritin-like cage protein with high affinity and selectivity for certain inorganic materials.** *Small*, v. 1, n. 8-9, p. 826-832, 2005.

TOSHA, T. et al. **Moving metal ions through ferritin-protein nanocages from three-fold pores to catalytic sites.** *J Am Chem Soc.*, v. 132, p. 14562–14569, 2010.

YANG, F. et al. **Resistance of hypotransferrinemic mice to hyperoxia-induced lung injury.** *Am J Physiol*, v. 277, p. 1214–1223, 1999.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Aconselhamento genético 94

Adolescentes 12

Alimento 12

Anacardium occidentale 7, 59, 60, 61, 66, 67

Atividade antioxidante 59, 65

B

Botânica 1, 3, 10

C

Clorofila 73, 77

Conteúdo fenólico 59

Crianças 12, 19

Crispr/Cas9 45, 46

D

Dieta 12

E

Espermatogênese 45

Estratégias de ensino 1

F

Ferritina 89

Fragilidade osmótica 27

L

Lagoa marginal 78

M

Myracrodruon urundeuva 7, 59, 60, 61, 66, 67

N

Nutrição 11, 14, 20

P

Piptadenia satipulaceae 23

S

Síndrome de Angelman 7, 93, 94

Síndrome de Down 5, 11, 12, 13, 19, 21

T

Toxicidade 23, 29

Translocação balanceada 7, 93, 94

Trauma cranioencefálico 36, 44

Z

Zebrafish 45, 46, 48, 49, 51, 57, 58

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-540-2



9 788572 475402