

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES  
NÉLIA FERREIRA DE SOUZA**

**EXPRESSÃO DA ACTIVINA A HUMANA RECOMBINANTE  
EM *Pichia pastoris*: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
BIOLÓGICA**

**Mogi das Cruzes, SP  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES  
NÉLIA FERREIRA DE SOUZA**

**EXPRESSÃO DA ACTIVINA A HUMANA RECOMBINANTE  
EM *Pichia pastoris*: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
BIOLÓGICA**

Dissertação apresentada à Universidade Mogi das Cruzes para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Prof.º Dr. Jorge Luiz Pesquero

**Mogi das Cruzes, SP  
2008**

### FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Souza, Nélia Ferreira de

Expressão da activina A humana recombinante em *pichia pastoris* : purificação e caracterização biológica / Nélia Ferreira de Souza. -- 2008.

73 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2008

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero

1. Activina A humana recombinante 2. *Pichia pastoris* 3. Reprodução 4. FSH 5. Hormônio recombinante I. Título II. Pesquero, Jorge Luiz

CDD 619.93

**ATAS**

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**


Às quatorze horas e trinta minutos do dia vinte e nove de janeiro de dois mil e oito, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "EXPRESSÃO DA ACTIVINA A HUMANA RECOMBINANTE EM *Pichia pastoris*. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Nélia Ferreira de Souza**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 52 (cinquenta e dois), a saber: 28 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Jorge Luiz Pesquero e João Lúcio de Azevedo da Universidade de Mogi das Cruzes e Ivan Carlos dos Santos do Centro Universitário UNA, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADA por UNANIMIDADE  
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

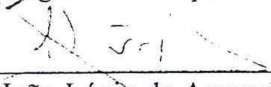
Mogi das Cruzes, 29 de janeiro de 2008.

Comissão Examinadora

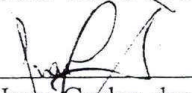
Julgamento

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero

APROVADA  
(aprovado(a)/reprovado(a))

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

APROVADA  
(aprovado(a)/reprovado(a))

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ivan Carlos dos Santos

APROVADA  
(aprovado(a)/reprovado(a))

## **DEDICATÓRIA**

Ao professor doutor Jorge Luiz Pesquero, que me concedeu uma oportunidade de ingressar à pesquisa científica. Sou grata por tudo, pela orientação, paciência e amizade que foi construída ao longo desta trajetória.

## AGRADECIMENTOS

Às minhas grandes amigas de laboratório **Débora Higuchi, Meire Coelho**. Agradeço o carinho, apoio, auxílio e amizade que perdurará.

Aos professores **João Carlos Nogueira e Ingrid Perone** da UMC, pelas análises histológicas.

Aos amigos do laboratório pelos momentos alegres e apoio: **Amanda, Anderson, Débora, Prof. Douglas, Eurípedes, Fernanda, Kaká, Meire, Milton, Rodrigo, Sandro, Thiago** e em especial ao **João Daivision** da Escola Paulista de Medicina.

Ao Prof. Dr. **Ronaldo Araújo** da Escola Paulista de Medicina, por disponibilizar laboratório, equipamentos, recursos materiais e contribuição à pesquisa. Agradeço por tudo.

Ao Prof. Dr. **Wellington Luiz Araújo**, pelo estágio docente e amizade. Aprendi muito com você.

Aos professores das *disciplinas que cursei* no mestrado pela grande contribuição à minha formação profissional e pessoal:

Prof. Dr. **Ivarne Tersariol**

Prof. Dra. **Iseli Lourenço**

Prof. Dr. **João Lúcio**

Prof. Dr. **Luiz Nunes**

Prof. Dra **Regina Costa**

Prof. Dra. **Claudia Bincoletto**

Prof. Dr. **Ronaldo Araújo**

Prof. Dr. **Moacyr Wuo**

Prof. Dr. **Pedro Frare**

Prof. Dr. **Wellington L. Araújo**

Prof. Dra. **Maria Santana**

Aos funcionários **Douglas, Paulo** e o veterinário **Maurício** do Biotério da UMC que sempre me disponibilizaram ratas para os experimentos.

Aos amigos da empresa Exa-M (Intec) pela cooperação e momentos alegres: **Valter, Patricia, Samir, Flávio, Mário, Mauricio, Odair, Prof. Paulo e Roberta**.

Às grandes amigas **Nicolina, Simone e Geralda**, pelo carinho, estímulo e atenção.

À minha querida família: **Vilson, Nelian, Mariléia, Viviane e Luiz, Elaine, Carol, Fê e Mari**.

Ao meu querido noivo **André Luiz**. Amo você.

À **Deus**, por guiar os meus caminhos.

“As dores e esperanças de nosso tempo dependem, sem dúvida das causas materiais, dos fatores econômicos e técnicos que desempenham papel essencial no movimento da história humana; mas, ainda mais profundamente dependem das idéias, do drama em que o espírito está engajado, das forças invisíveis que nascem e se desenvolvem em nossa inteligência e em nosso coração: porque a história não é um desenrolar mecânico de acontecimentos no meio do qual o homem estaria simplesmente *situado* como um estranho; a história humana é *humana* na sua substância; é a história de nosso próprio ser, dessa carne miserável, submetida a todo o senhorio da natureza e de sua própria fraqueza, mas assim mesmo habituada e informada por um espírito, que lhe confere o terrível privilégio da *liberdade*. Nada, pois, é mais importante do que tudo o que ocorre dentro do universo invisível, que é o espírito do homem. Ora, a luz desse universo é o *conhecimento*. De onde se conclui que uma das condições exigidas para o homem, ou para o advento de uma civilização, é a volta às fontes autênticas do conhecimento: para sabermos o que é o conhecimento, qual é o valor, quais são os seus graus, e como pode ele assegurar a unidade interior do ser humano.”

(**Jacques Maritain**, *Raiso et Raisons*, Egloff, Paris, 1947)



## RESUMO

A activina A é uma proteína dimérica, constituída por duas subunidades  $\beta$ -A de inibina, ligadas por pontes dissulfeto. Pertencente à superfamília dos fatores de crescimento de transformação beta (TGF- $\beta$ ), a activina A desempenha um papel crucial na reprodução, atuando na expressão de gonadotropinas, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), bem como no desenvolvimento e maturação dos folículos ovarianos. Em mamíferos o FSH é o responsável primário pela regulação dos processos de crescimento e desenvolvimento folicular. A activina A constitui o principal estímulo à síntese de FSH, pois possui a habilidade de ativar a transcrição gênica através do promotor da cadeia beta deste hormônio. Via expressão de FSH, a activina A contribui para o aumento da expressão de LH. Além da expressão de gonadotropinas, a activina A atua diretamente na foliculogênese, agindo como um mitógeno e um regulador local da esteroidogênese, promovendo rápida proliferação, crescimento, diferenciação, maturação folicular e ovulação prematura. Neste estudo, propõe-se colaborar com um projeto de reprodução, que almeja produzir uma composição de hormônios *recombinantes* que apresentem funções sinérgicas no processo de superovulação de mamíferos. Esta combinação seria composta de FSH e activina A (que potencializa o efeito de FSH). Com este intuito, neste trabalho, a activina A humana recombinante foi expressa pela primeira vez em *Pichia pastoris*, um promissor sistema eucarioto de expressão. Como sistema fermentador, foi utilizada a tecnologia de biorreatores e para concentração da proteína empregou-se o sistema hollow-fiber. A proteína foi purificada por cromatografia líquida de filtração em BioGel P-30, em sistema FPLC. A atividade biológica da proteína bruta e purificada foram avaliadas em sete grupos de ratas *Wistar* no estágio da peripuberdade, em diferentes dosagens para cada grupo tratado, durante três dias de tratamento. Entre grupos tratados e controles, ao todo 86 ratas foram avaliadas. O peso relativo do ovário, determinado em função do peso corporal, para os grupos tratados, foram comparados aos respectivos controles. Em todos os grupos tratados foram observados aumento significativo da massa ovariana em relação ao seu controle, indicando que a activina A humana recombinante produzida está ativa, pois gerou resposta biológica no desenvolvimento e maturação dos folículos ovarianos como confirmado por análise histológica. Na análise histológica dos ovários tratados foi observado a presença de corpos lúteos, indicativo de que ocorreu ovulação prematura destes folículos. Nos controles, nenhuma ovulação foi observada. Em conclusão, um novo método para produzir uma proteína recombinante foi estabelecido. A proteína produzida apresentou-se biologicamente ativa. *Pichia pastoris* constitui um excelente sistema para expressar a activina A humana recombinante.

**Palavras-chave:** activina A humana recombinante - *Pichia pastoris* - reprodução – FSH.

## ABSTRACT

Activin A is a dimeric protein, composed of two  $\beta$ -A subunits, linked by disulfide bond. Belonging to the super family of the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), activin A plays crucial role in the expression of gonadotropins as the follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), as well as in the development and maturation of the ovarian follicles. In mammalian, FSH is the primary responsible for the regulation of the growth processes and follicular development. The activin is the main FSH synthesis stimulator, since it is able to activate the gene transcription through the promoter of the beta chain of this hormone. By expression of FSH, activin contributes to the increase of the LH expression levels. In addition to the expression of gonadotropins, activin A act directly upon folliculogenesis as a mitogen and a local regulator of esteroidogenesis, promoting fast proliferation, growth, differentiation, maturation of follicle and premature ovulation. In this study the recombinant human activin A has being expressed for the first time in cells of *Pichia pastoris*, a promising eukaryotic system of expression. It was used the technology of bioreactors and for separation of the cells and protein the hollow-fiber system. The protein was purified by liquid chromatography of gel filtration in Biogel P-30, in FPLC system. The biological activity of the crude product and purified protein was evaluated in seven groups of Wistar rats in peripubertal stage, with different doses during three days of treatment. As a control, it was injected equal volume of saline solution (NaCl 0.9%). Eight-six rats were used in this study. The relative ovarian mass was determined as ovarian mass/body weight mass ratio. In all the treated groups it was observed significant increase of the relative ovarian mass when compared to the controls, indicating that the human recombinant activin A is active. In the histological analysis of the treated ovaries it was observed the presence of luteo bodies, indicative that premature ovulation occurred. In the controls, no ovulation was observed. The histological analysis supplied a new evidence for the activity of the recombinant protein. In conclusion, a new method to produce a recombinant activin A was established. The protein presented biologically active. *Pichia pastoris* constitutes an excellent system to express human activin A.

**Keywords:** human recombinant activin-A - *Pichia pastoris* – reproduction – FSH.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Subunidades protéicas formadoras de inibinas e activinas.....	13
<b>Figura 2.</b> Folículos ovarianos em desenvolvimento.....	15
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de sinalização celular das activinas.....	17
<b>Figura 4.</b> Eletroforese da proteína obtida em fermentação.....	30
<b>Figura 5.</b> Imunotransferência do produto obtido na fermentação.....	31
<b>Figura 6.</b> Cromatografia de filtração em gel.....	32
<b>Figura 7.</b> Eletroforese do material obtido em filtração em gel .....	33
<b>Figura 8.</b> Comparação entre o efeito da menor dose com a maior dose de rACT.....	34
<b>Figura 9.</b> Fotografia de corte histológico de ovário de rata tratada com 50 µg rACT.....	35
<b>Figura 10.</b> Fotografia de corte histológico de ovário de rata tratada com 0,1 µg rACT.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ActR I</b>	Receptor de activina tipo I
<b>ActRIA ou ALK2</b>	1º subtipo de receptor tipo I da activina
<b>ActRIB ou ALK4</b>	2º subtipo de receptor tipo I da activina
<b>ActRII</b>	Receptor da activina tipo II
<b>ActRII A</b>	1º subtipo de receptor tipo II da activina
<b>ActRIIB</b>	2º subtipo de receptor da activina
<b>AOX1</b>	Promotor 1 da expressão da álcool oxidase em <i>pichia pastoris</i>
<b>BSA</b>	Soroalbumina bovino
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>D. O.</b>	Densidade ótica
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>FPLC</b>	Fast Protein Liquid Chromatography
<b>FSH</b>	Hormônio folículo-estimulante
<b>GIFT</b>	Transferência intrafalopiana de gametas
<b>GnRH</b>	Hormônio liberador de gonadotrofinas
<b>IA</b>	Inseminação artificial
<b>LH</b>	Hormônio luteinizante
<b>MGY</b>	Meio de glicerol e extrato de levedura
<b>pACT</b>	Plasmídeo contendo inserto de cDNA da activina
<b>PBS</b>	Salina fosfato tamponada
<b>pPIC9</b>	Vetor de secreção e expressão em <i>Pichia pastoris</i>
<b>PMSG</b>	Gonadotropina de éguas prenhas
<b>PSA</b>	Persulfato de amônio
<b>P. R.</b>	Peso Relativo
<b>rACT</b>	Activina A humana recombinante
<b>RPM</b>	Rotação por minuto
<b>Sal</b>	Salina
<b>SDS</b>	Duodecil fosfato de sódio
<b>TE</b>	Transferência de embriões
<b>TGF-β</b>	Fatores de transformação do crescimento beta
<b>YNB</b>	Meio de extrato de levedura, peptona e dextrose

# SUMÁRIO

<b>1 Introdução.....</b>	<b>12</b>
1.1 Activinas.....	12
1.2 Superovulação.....	18
1.3 Sistema de expressão e produção de proteínas heterólogas.....	19
1.3.1 Sistemas procarióticos.....	19
1.3.2 Sistemas eucariotos.....	20
1.4 Justificativa.....	22
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>24</b>
<b>3 Método.....</b>	<b>25</b>
3.1 Materiais.....	25
3.1.1 Leveduras.....	25
3.1.2 Animais.....	25
3.1.3 Colunas e reagentes.....	25
3.1.4 Anticorpos.....	25
3.2 Procedimentos.....	25
3.2.1 Expressão em sistema fermentador.....	25
3.2.1.1 Pré-inóculo.....	25
3.2.1.2 Passagem do pré-inóculo para o biorreator.....	26
<b>3.2.1.3 Fase de indução.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.2 Separação e concentração da proteína.....</b>	<b>26</b>
3.2.2.1 Sistema hollow-fiber .....	26
<b>3.2.3 Estimativa da concentração protéica.....</b>	<b>26</b>
3.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	27
3.2.4.1 Coloração por prata.....	27
3.2.5 Eletrotransferência e imunoblote.....	27
3.2.2 Cromatografia líquida.....	28
3.2.2.1 Cromatografia de filtração em gel.....	28
3.2.6 Atividade biológica.....	28
3.2.7 Análise histológica.....	29
3.2.8 Análise estatística.....	29
<b>4 Resultados.....</b>	<b>30</b>
4.1 Expressão.....	30

4.2 Purificação.....	32
4.3 Atividade biológica.....	33
4.3.1 Massa ovariana.....	33
4.3.2 Análise histológica.....	34
<b>5 Discussão.....</b>	<b>36</b>
<b>6 Conclusões e sugestões.....</b>	<b>42</b>
<b>8 Referências.....</b>	<b>43</b>
<b>Apêndice A - Resultados obtidos com outros tratamentos de rACT bruta e purificada.....</b>	<b>58</b>
<b>Anexos A - Plasmideo contendo cDNA da cadeia beta da activina.....</b>	<b>62</b>
<b>Anexo B - Meios de cultura e soluções.....</b>	<b>63</b>
Meio de cultura YPD.....	64
Meio de cultura MGY.....	64
Meios e soluções para biorreator.....	64
Soluções utilizadas para estimar concentração de proteínas.....	65
Soluções para SDS-PAGE.....	66
Soluções para Western blotting.....	68
Soluções para cromatografia líquida: Tampões e solventes.....	69
<b>Anexo C - Protocolo técnica H/E.....</b>	<b>70</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Em mamíferos o controle da função gonadal é exercido predominantemente através de hormônios gonadotrópicos, secretados pela adeno-hipófise. Estes incluem as duas glicoproteínas denominadas hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). O FSH é o responsável primário pela regulação dos processos de crescimento e desenvolvimento de células germinativas (BICHET, 1997; GAJEWSKA *e cols.*, 2002).

A síntese, secreção e ação do hormônio folículo-estimulante (FSH) são cruciais para as funções reprodutivas (ABEL *e cols.*, 2000; DIERICH *e cols.*, 1998; KUMAR *e cols.*, 1997; KUMAR *e cols.*, 2003; LAYMAN E MCDONOUGH, 2000; THEMEN E HUHTANIEMI, 2000; GAJEWSKA *e cols.*, 2002). A produção de FSH é regulada por uma variedade de fatores neuroendócrinos, intra-pituitários e gonádicos. Contudo, os estimuladores mais potentes à síntese de FSH são conferidos às activinas (BARATTA *e cols.*, 2001; BILEZIKJIAN *e cols.*, 2004; PANKAJ *e cols.*, 2006; ROBERTS *e cols.*, 1989; WOODRUFF *e cols.*, 1998).

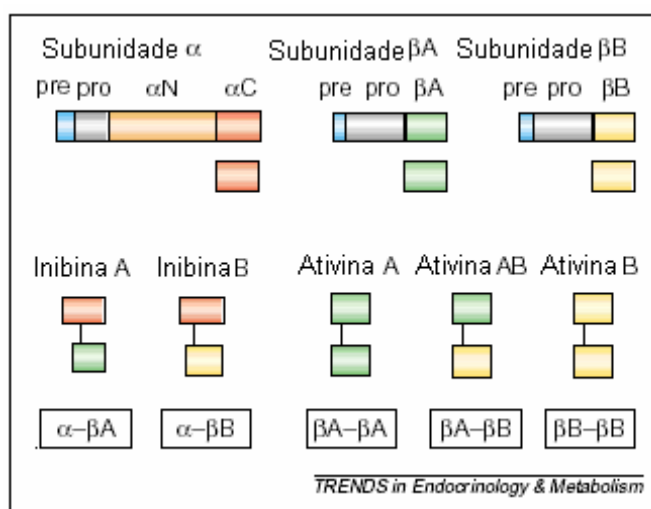
## 1.1 ACTIVINAS

Activinas ou ativinas são proteínas diméricas, inicialmente isoladas do fluido folicular gonádico em três diferentes isoformas (LING *e cols.*, 1986; NAKAMURA *e cols.*, 1992; VALE *e cols.*, 1986; RIVIER *e cols.*, 1985). Cada isoforma é constituída por duas subunidades beta de inibina (figura 1) ligadas por uma ponte dissulfeto e possuem peso molecular de aproximadamente 21 a 28 kDa o dímero e 13 kDa por monômero (BURGER *e cols.*, 2004; GREGORY *e cols.*, 2005; LING *e cols.*, 1986). De acordo com a dimerização, são classificadas como activina A ( $\beta$ A- $\beta$ A), activina AB (BA- $\beta$ B) e activina B ( $\beta$ B- $\beta$ B) (BURGER *e cols.*, 1988; KNIGHT E GLISTER, 2003; SCHWALL *e cols.*, 1999; VALE *e cols.*, 1986).

Novos membros da activina foram descritos, activinas  $\beta$ C,  $\beta$ D e  $\beta$ E (FANG *e cols.*, 1996; H TTEN *e cols.*, 1995; LAU *e cols.*, 2000; MELLOR *e cols.*, 2000; ODA *e cols.*, 1995). As activinas possuem o peso molecular de aproximadamente de 21 a 28 kDa para o dímero e 13 kDa cada monômero. Todos os membros fazem parte da superfamília dos fatores de transformação do crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), e representam um grupo de fatores com estrutura e funções similares, que regulam a proliferação e função da maioria das células dos vertebrados. De acordo com suas características estruturais os membros foram classificados em

subfamílias. Mais de 35 membros TGF- $\beta$  já foram identificados em vertebrados (KNIGHT E GLISTER, 2006; LIN *e cols.*, 2003; LIN *e cols.*, 2006; LING, 1986; MASSAGUÉ, 1994; MASSAGUÉ, 1998; MCPHERRON *e cols.*, 1993; MUTTUKRISHNA *e cols.*, 2004).

Desde a identificação da activina até os dias atuais, diversas linhas de pesquisas demonstram que a activina não é sintetizada apenas nas gônadas, mas também em outros tecidos e fluidos biológicos e possui larga escala de expressão incluindo hipotálamo, glândula pituitária, adrenal e placenta (LUISI *e cols.*, 2001; ROBERTS *e cols.*, 1992).



**Figura 1.** Subunidades proteicas formadoras de inibinas e activinas. Adaptação de JONES *e cols.* (2002).

As activinas participam de numerosos processos fisiológicos, tais como eritropoiese (FINDLAY, 1993; MATHER *e cols.*, 1992; WOODRUFF, 1998), diferenciação, remodelagem celular e processos inflamatórios (MUNZ *e cols.*, 1999; JONES *et al.*, 2001), sobrevivência neural das células (SMITH *e cols.*, 1990), diferenciação de células beta pancreáticas (ZANG *e cols.*, 2002), regeneração de tecidos do fígado (KOGURE *e cols.*, 2000), angiogênese (MAESHIMA *e cols.*, 2004), morfogênese de órgãos glandulares (BALL E RISBRIDGER, 2001), reparo do tecido de vários órgãos (HÜBNER *e cols.*, 1999; MAESHIMA *e cols.*, 2001; WERNER E ALZHEIMER, 2006), inibição da proliferação celular em vários tecidos de humanos, incluindo células cancerígenas da mama (KALKHOVEN *e cols.*, 1995) e endotélio vascular (KOZIAN *e cols.*, 1997), pluripotência e diferenciação das células tronco (BEATTIE *e cols.*, 2005), mecanismo de reparo, adesão celular, apoptose (LUISI *e cols.*, 2001). A maior parte dos efeitos citados são exercidos pela activina A, no entanto, a maior parte dos estudos relacionados a essa proteína, referem-se à eventos reprodutivos. Nestes estudos são empregados activina A humana *recombinante*, como



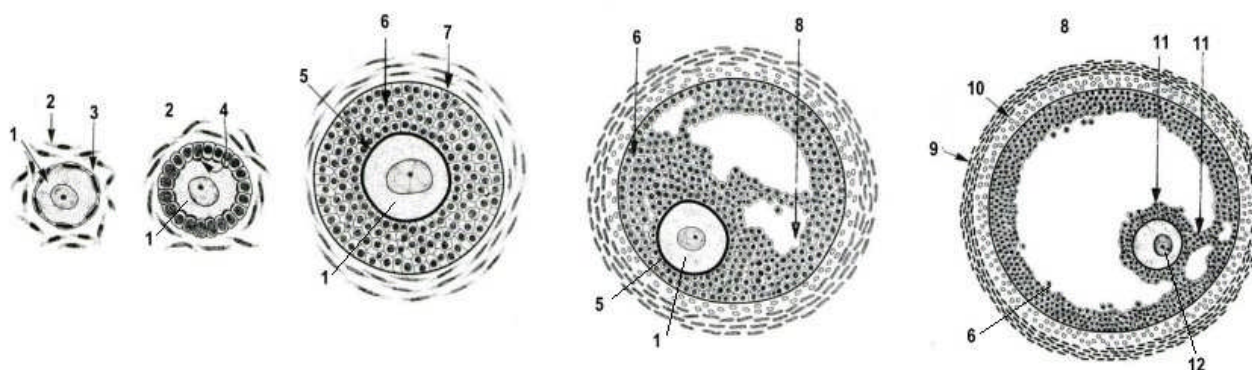
também são utilizados o fator de diferenciação do eritróide (EDF), que é um polipeptídeo que possui exatamente a mesma estrutura química da activina A, apresentando os mesmos efeitos biológicos (DOI *e cols.*, 1992). Em processos reprodutivos a activina A humana recombinante desempenha importante papel na embriogênese, expressão de gonadotropinas e maturação de folículos ovarianos (DOI *e cols.*, 1992; ERICKSON *e cols.*, 1995; EITHER E FINDLAY, 2001; KISHI *e cols.*, 1998; KNIGHT E GLISTER, 2006; LAMBA *e cols.*, 2005; YOKOTA *e cols.*, 1997; LI *e cols.*, 1995; MATHEWS, 1994; RABINOVICI *e cols.*, 1990; SILVA *e cols.*, 2004; SUSZKO *e cols.*, 2005 e 2003; WOODRUFF *e cols.*, 1998). Estudos *in vivo* com embriões de *Xenopus laevis* indicaram que a activina A é um forte indutor da mesoderme, formação da linha central do corpo e organogênese do embrião (PIEPENBURG *e cols.*, 2004). A distribuição da activina A em espermátocitos, óvulos fertilizados ou não e em vários órgãos durante a embriogênese sugerem importante ação deste hormônio durante o desenvolvimento embrionário (VALE *e cols.*, 1994).

Além da embriogênese, a activina A exerce muitos outros efeitos na reprodução: participa do controle, em nível do hipotálamo e ovário, da expressão de diversos hormônios como o FSH e LH, e da maturação dos folículos ovarianos (KISHI *e cols.*, 1998; EITHER E FINDLAY, 2001; SILVA *e cols.*, 2004).

O FSH é uma glicoproteína heterodimérica composta por duas cadeias denominadas alfa e beta, ligadas não covalentemente, sendo a cadeia beta responsável por conferir à molécula atividade biológica espécie-específica. As cadeias são codificadas por genes distintos, localizados em diferentes cromossomos. A meia-vida do FSH é muito curta e o nível de expressão dos seus receptores pequena (GAJEWSKA *e cols.*, 2002). O promotor da cadeia beta é regulado principalmente pela activina A (BURGER *e cols.*, 2004; CARROL *e cols.*, 1991; GAJEWSKA *e cols.*, 2002; GREGORY *e cols.*, 2005; WEISS *e cols.*, 1995). A habilidade de ativar a transcrição do gene de FSH- $\beta$  confere a activina um papel autócrino e parácrino chave na função do FSH (BARATTA *e cols.*; 2001; CARROLL *e cols.*, 1989; CORRIGAN *e cols.*; 1991; NAKAMURA *e cols.*, 1993; ROBERTS *e cols.*, 1989; WEISS *e cols.*, 1995).

Na fêmea o FSH é essencial para a maturação folicular (LAMBA *e cols.*, 2005). Os folículos são as unidades funcionais dos ovários. Cada folículo consiste em um oócito cercado por uma ou mais camadas de células somáticas. Para que seu potencial esteroidogênico e ovulatório seja alcançado, os folículos devem progredir com série prolongada e altamente coordenada de estágios de desenvolvimento (figura 2). O crescimento folicular caracterizado por mudanças morfológicas e desenvolvimento funcional é denominado foliculogênese

(RICHARDS, 2002). O processo de foliculogênese começa com a formação do folículo primordial no ovário e culmina com a luteinização e ovulação ou atresia folicular (HIRSHFIELD, 1991; HIRSHFIELD E MIDGLEY, 1978; HIRSHFIELD, 1985; RICHARDS, 2002).



**Figura 2.** Folículos ovarianos em diferentes fases de desenvolvimento. **A-** Folículo primordial; **B-** Folículo primário; **C, D-** Folículos secundários (ou em crescimento); **E-** Folículo terciário (ou de Graaf). 1. ovócito primário; 2. tecido conjuntivo do ovário; 3. células foliculares achatadas; 4. células foliculares cúbicas; 5. membrana pelúcida; 6. granulosa; 7. envoltório externo do folículo ou teca; 8. antro folicular; 9. teca externa; 10. teca interna; 11. células do cumulus oophorus; 12. ovócito secundário. Universidade São Paulo, 2007.

O FSH está envolvido no estímulo ao recrutamento, crescimento, atresia e ovulação de folículos ovarianos. Em folículos primordiais, o ovócito é envolvido por uma única camada de célula da granulosa, estacionadas na fase  $G_0$  do ciclo celular. Sob estímulos específicos, estas células deixarão este estado quiescente e iniciarão uma fase de crescimento lento (RICHARDS, 1980; RICHARDS *e cols.*, 2002). Conforme estas células vão obtendo maior exposição e responsividade ao FSH, elas iniciam a produção de estrógenos promovendo uma rápida proliferação que resulta em folículos pré-ovulatórios. Nesta fase, as células da granulosa adquirem receptores para o LH que promovem mudanças na função e estrutura folicular provocando a saída do ciclo celular das células da granulosa que rapidamente iniciam o processo de luteinização (RICHARDS *e cols.*, 2002; UILENBROEK E RICHARDS, 1979).

Li *e cols.* (1995) mostraram que a activina dá suporte à sobrevivência das células da granulosa e à proliferação celular além de manter, em cultura, os receptores de FSH funcionando na ausência deste.

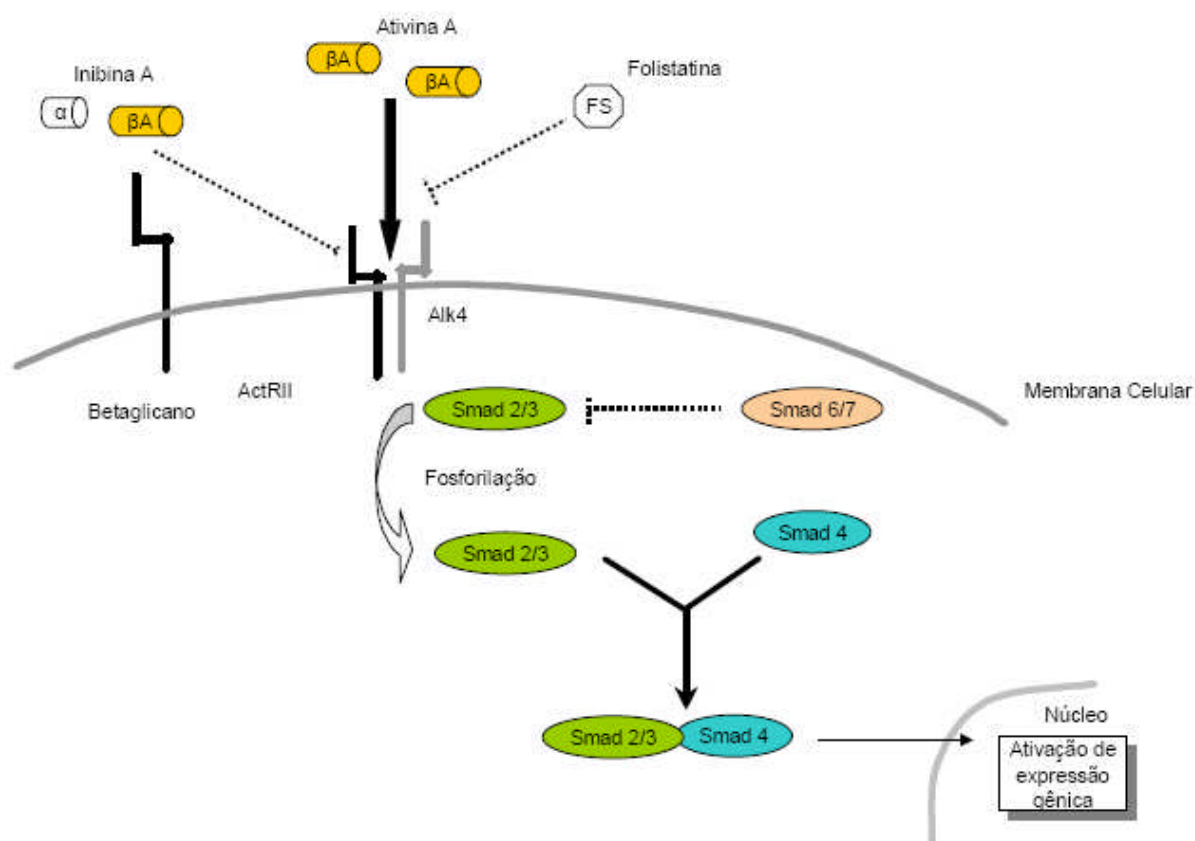
A activina na presença ou na ausência de FSH, possui nas células da granulosa, ação autócrina, promovendo diferenciação durante os estágios pré-antrais da foliculogênese e *in vitro*, previne a luteinização prematura dos folículos antrais (FINDLAY, 1993). Sabe-se

também que a activina aumenta o número de células produtoras de FSH em cultura de hipófise anterior (KATAYAMA *e cols.*, 1990).

Estudos com células ovarianas de ratos e bovinos constataram que a activina regula diretamente os processos intraovarianos (HASEGAWA *e cols.*, 1988; HUTCHINSOW *e cols.*, 1987; XIAO *e cols.*, 1990; WOODRUFF *e cols.*, 1990; SHUKOVSKI E FINDLAY, 1990), agindo como um modulador local da esteroidogênese (LING *e cols.*, 1986), mitogênese (RABINOVICI, 1990) e proliferação das células da granulosa. Activina exerce controle autócrino e parácrino no desenvolvimento folicular adiantado, promovendo o crescimento, diferenciação e a maturação folicular, como também estimula a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo e o aumento expressão de LH induzida pela produção de FSH e de progesterona (ETHIER E FINDLAY, 2001; FINDLAY, 1993; MATHER *e cols.*, 1997; MATHER *e cols.*, 1992)

A atividade biológica da activina A pode ser mediada por receptores específicos da superfície celular, conhecidos como receptores *serinotreoninoquinases*. Existem dois tipos de receptores de activina (Figura 3) que formam o complexo funcional, denominados receptor tipo I (ActRI) e tipo II (ActRII). A ligação da activina se faz com o ActRII, provocando o recrutamento e ativação do ActRI. O ActRI ativado fosforila uma molécula sinalizadora da família Smad (Smad 2 ou Smad 3), que então interage com a Smad 4 e este complexo se transloca para o núcleo, onde promove expressão gênica (ATTISANO *e cols.*, 2001; BERNARD *e cols.*, 2001; BERNARD, 2004; JONES *e cols.*, 2002; KALKHOVEN *e cols.*, 1995; LIN *e cols.*, 2003). A família Smad é um conjunto de moléculas responsáveis pela sinalização intracelular. Existem três classes destas moléculas de transdução: as R-Smad, que são as moléculas ativadas pela subunidade RI do receptor, as Common Smad, ou mediadores comuns que formam um complexo heteromérico com as R-smad e translocam para o núcleo para ativar as respostas gênicas específicas, e as Inhibitory Smad que são potentes inibidores do sinal de activina (ATTISANO *e cols.*, 2001; BERNARD *e cols.*, 2001; GRAY *e cols.*, 2001; KNIGHT E GLISTER, 2006; MATHEWS, 1994; SUSZKO *e cols.*, 2003; SUSZKO *e cols.*, 2005; TSUCHIDA *e cols.*, 2001).

Já foram identificados dois subtipos de receptores tipo II (ActRIIA e ActRIIB) e dois subtipos de receptores tipo I (ActRIA ou ALK2-activin receptorlike kinase 2 e ActRIB ou ALK4). Entretanto, o ActRIA está mais associado à sinalização das BMPs (bone morphogenetic proteins) do hormônio antimulleriano, indicando que o ActRIB é o principal receptor tipo I envolvido no mecanismo de ação da activina (JONES *e cols.*, 2002; SUSZKO *e cols.*, 2003; SUSZKO *e cols.*, 2005).



**Figura 3.** Mecanismo de sinalização celular das ativinas. NASCIMENTO, 2006.

A bioatividade da activina é neutralizada pela folistatina (HARRINGTON *e cols.*, 2006). Folistatina é uma glicoproteína produzida pelas células da granulosa e pituitárias. Esta glicoproteína liga-se com alta afinidade à activina, bloqueando sua interação com seus receptores, gerando um complexo inativo. Desta forma a folistatina suprime a produção de FSH. Por um mecanismo similar à folistatina, a inibina antagoniza a activina também suprimindo o FSH. Neste caso há competição da inibina com activina A, pela interação com os seus receptores II (ActRII). No entanto a afinidade da inibina ao receptor da activina é baixa. Recentemente foi descoberto que a inibina liga-se com alta afinidade ao receptor betaglicano TGF- $\beta$  III, facilitando a interação com o receptor tipo II da activina. A inibina regula a biodisponibilidade da activina (HARRINGTON *e cols.*, 2006; LIN *e cols.*, 2003; BILEZIKJIAN *e cols.*, 2004; JONES *e cols.*, 2002).

Os receptores da activina A que regulam atividade autócrina e parácrina da foliculogênese estão presentes no ovário e os seus níveis são reguladas durante o ciclo ovariano (WOODRUFF *e cols.*, 1993)

A ação da activina A, sinérgica com FSH, resulta em um aumento significativo na expressão dos receptores do FSH (KISHI *e cols.*, 1998), elevando o número destes receptores nos folículos pré-antrais. Neste contexto, o FSH potencializa seus próprios receptores nas células da granulosa (DOI *e cols.*, 1992; WOODRUFF, 1990).

Embora seja conhecido o efeito da activina A sobre a expressão dos receptores de FSH, não existe qualquer informação a respeito da ação combinada destes dois hormônios nos processos de superovulação, qualidade e viabilidade de embriões.

## 1.2 SUPEROVULAÇÃO

Entre os processos de superovulação e de tecnologia de reprodução assistida empregadas atualmente, a transferência de embriões (TE) é uma das mais interessantes. Consiste na estimulação hormonal dos ovários de uma fêmea de excelência genética (doadora) gerando o desenvolvimento e maturação de vários folículos simultaneamente (superovulação). Após fecundação natural ou inseminação artificial (IA), os embriões são coletados através de lavagem uterina e transferidos para fêmeas receptoras, que levarão a gestação a termo (HAFEZ *e cols.*, 1993). A eficiência deste processo é de aproximadamente 60% (PEREIRA, 1996) e vários são os fatores responsáveis por este índice, podendo ser citados principalmente a individualidade das doadoras, a nutrição, ao ambiente onde elas se encontram entre outros. Contudo, o fator mais importante no processo superovulatório relaciona-se à qualidade dos produtos hormonais utilizados para estimular os ovários. Dentre as preparações hormonais utilizadas para superovulação disponíveis comercialmente são encontradas aquelas que possuem ação de FSH, como PMSG (gonadotropina de éguas prenhas) e aquelas contendo extrato de adeno-hipófise de suíno ou ovino, no qual o FSH encontra-se parcialmente purificado. Os FSHs tanto de suíno como ovino podem ser utilizados na superovulação de bovinos, pois possuem homologia estrutural de aproximadamente 70%. Os métodos empregados consistem na administração de extrato bruto de hipófise de suíno ou ovino liofilizados ou gonadotropinas urinárias de mulher e coriônica (HAFEZ *e cols.*, 1993). O risco de contaminação entre espécies, as diferenças entre as seqüências primárias das proteínas e a composição dos resíduos de carboidratos que é muito variável, podem ser os motivos da baixa eficiência destes processos. É verificada, já na segunda administração destas preparações, a presença de anticorpos específicos contra os hormônios de embriões. Por este motivo o intervalo de coleta em uma doadora é de 60 a 90 dias, o que permite uma média de 4 coletas por ano por doadora (HAFEZ *e cols.*, 1993).

Pelo fato de o FSH possuir meia-vida curta, faz-se necessário a utilização de grandes doses ou doses freqüentes para a utilização clínica em humanos. Esta mesma situação ocorre em bovinos, cujo protocolo de superovulação atual utiliza grandes doses (em torno de 400 mg) divididas em 2 dose diárias durante 4 dias para resposta satisfatória (SOERS *e cols.*, 1979).

Esse quadro atual, aponta para a necessidade do desenvolvimento de um sistema de expressão eficiente e promissor, para a produção de homônios recombinantes destinados à superovulação de mamíferos.

### 1.3 SISTEMAS DE EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS

Com o desenvolvimento da biotecnologia surgiram inúmeros sistemas, alguns mais recentes outros mais antigos, que utilizam genes clonados para a produção de proteínas recombinantes. Podemos dividir a produção de proteínas em dois grandes sistemas: os sistemas procarióticos, representados pelas bactérias e os sistemas eucarióticos, representado por fungos, baculovírus, células animais, animais transgênicos e plantas.

#### 1.3.1 Sistemas procarióticos

Dentro das linhagens de bactérias usadas para a produção de proteínas heterólogas, *Escherichia coli* é um dos microrganismos mais utilizados e bem caracterizados (BANEYX, 1999). Mas mesmo com o desenvolvimento de ferramentas genéticas para produção de proteínas de organismos eucarióticos em organismos procarióticos, existem ainda inúmeros problemas. Alguns em relação à própria seqüência do gene eucariótico, como por exemplo: o gene exógeno eucariótico pode conter íntrons, e a bactéria não possui maquinaria necessária para remoção dos transcritos, mas que pode ser contornado com a clonagem do RNAm maduro; o gene exógeno pode conter seqüências que atuam como sinais de terminação, resultando em uma terminação prematura e perda da expressão gênica; viés de códons do gene para a tradução, ocasionando uma redução da quantidade de proteína sintetizada (BROWN, 2001). No entanto, existem ainda outros problemas mais graves relacionados com o processamento correto da proteína recombinante: *a glicosilação, o enovelamento e a*

*síntese de ligações dissulfeto*. Muitas proteínas de eucariotos são glicosiladas, o que significa que após a tradução ocorrem modificações químicas em certos aminoácidos que se ligam a grupos de açúcares, N-ligados e O-ligados. Por outro lado, muitas proteínas, após serem sintetizadas, sofrem modificações estruturais que são responsáveis para o seu bom funcionamento. Nos organismos procarióticos proteínas responsáveis por esse enovelamento, chamadas chaperonas, não existem. Por isso, a proteína não adota a sua estrutura terciária com enovelamento correto se tornando geralmente insolúvel e inativa. Em alguns casos esse problema pode ser resolvido utilizando uma linhagem hospedeira para sintetizar grandes quantidades de proteínas chaperonas. Muitas proteínas apresentam ligações dissulfeto que estão relacionadas com o enovelamento da proteína. Outro problema, que não se sabe exatamente como funciona, mas que ocorre em *E. coli* é a degradação da proteína recombinante. A *E. coli* é capaz de reconhecer a proteína exógena e fazer dela um alvo preferencial para reciclagem (BANEYX, 1999).

### 1.3.2 Sistemas eucarióticos

Para a expressão e produção de proteínas heterólogas em sistemas eucariotos são utilizados fungos, células de insetos e de animais. As células eucarióticas mais utilizadas são as células de insetos e as inúmeras linhagens de células animais. Estas não apresentam, como as bactérias e leveduras, a capacidade de cultivos contínuos e algumas linhagens exigem uma superfície sólida para sua multiplicação, levando a uma velocidade de multiplicação e densidades celulares máximas muito menores, limitando o rendimento da produção (KOST E CONDREAY, 1999).

As células de insetos se comportam como células de mamíferos e apresentam grandes vantagens devido a um sistema natural de expressão que produzem as proteínas recombinantes com um alto rendimento. Seu sistema de expressão é baseado no baculovírus, um grupo de vírus que são comuns em insetos, mas aparentemente não infectam vertebrados. O genoma do baculovírus inclui o gene da poliedrina, cujo produto normal acumula-se nas células de insetos como grandes corpos de inclusão nucleares ao final do ciclo de infecção. O produto desse único gene freqüentemente chega a representar 50% da proteína celular total. Mas infelizmente as proteínas não são glicosiladas corretamente (KOST E CONDREAY, 1999).

Os fungos são organismos amplamente utilizados para a produção de proteínas recombinantes. Apresentam algumas características em comum com as bactérias como a capacidade de se multiplicar em cultivos contínuos, um rendimento altamente elevado e

a capacidade de processar uma proteína similar àquela que ocorre naturalmente em animais. Estas características fazem com que os fungos sejam organismos muito utilizados para a produção de proteínas heterólogas, principalmente quando a proteína é glicosilada, apresenta pontes dissulfeto e um enovelamento mais complexo (SREEKRISHNA *e cols.*, 1997).

Os dois fungos filamentosos mais populares são: *Aspergillus nidulans* com vetores com o promotor da glicoamilase, induzido por amido e reprimido por xilose e *Trichoderma reesei* com o promotor da celobioidrolase – induzido por celulose. As vantagens desses organismos são as suas boas propriedades de glicosilação e a capacidade de secretarem proteínas para o meio de cultivo, especialmente *Trichoderma reesei*.

As leveduras mais utilizadas são: *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*. Em relação a *Saccharomyces cerevisiae*, uma das mais bem estudadas, e que apresenta vários vetores com os promotores GAL, PHO5 e CUP1, apresenta alguns problemas em relação à incapacidade de glicosilar proteínas animais corretamente, adicionando um número excessivo de unidades de açúcar. O que não é observado na levedura *Pichia pastoris* e no fungo *Trichoderma reesei* (GELLISSEN E HOLLENBERG, 1997).

*Pichia pastoris* apresenta uma glicosilação muito mais similar àquelas de células animais, sendo a maioria de glicosilação N-ligado de manose e poucos O-ligado, o que faz com que não induzam uma reação antigênica se injetadas na corrente sanguínea, um problema freqüentemente encontrado com proteínas glicosiladas em excesso como é o caso de *S. cerevisiae* (SREEKRISHNA *e cols.*, 1997; GRINNA E TSCHOPP, 1989; TSCHOPP *e cols.*, 1987).

Mecanismos moleculares são hoje muito utilizados para minimizar possíveis problemas e ajudar na expressão de proteínas, como é o caso de *Pichia pastoris* com o vetor pPIC que contém o promotor da álcool oxidase (AOX1). Este vetor pode se inserir no genoma da levedura ou substituir o gene da álcool oxidase por recombinação homóloga (CREGG *e cols.*, 1989; CREGG *e cols.*, 2000; CEREGHINO *e cols.*, 2002), inserindo assim o gene de interesse para expressão de proteínas heterólogas. Assim, através do promotor AOX1 se pode controlar o nível de transcrição da proteína através da indução por metanol. Outra vantagem desse vetor é a utilização do peptídeo sinal de *S. cerevisiae* para secretar a proteína através da via secretória. As proteínas destinadas à membrana, lisossomos, peroxissomos e ao meio extracelular entram na chamada via



**secretória. As proteínas durante sua síntese adquirem suas conformações corretas, podendo ainda ser modificadas através de acetilação, amidação, sulfatação, fosforilação ou glicosilação. O direcionamento correto é baseado em sinais intramoleculares, bem como no pH das vesículas secretoras (BURGUES E KELLY, 1987; PRYER e cols., 1992).**

#### 1.4 JUSTIFICATIVA

Entre os vários sistemas de expressão e produção de hormônios descritos anteriormente, são utilizados principalmente células de mamíferos e de insetos. Estes sistemas são caracterizados por baixas produções (de 20 ng a 20 µg/mL) e estados de glicosilação diferentes, o que pode comprometer a atividade biológica do produto. Sabendo que são necessárias de 1500 a 3000 UI (160 a 400 mg; Vetrepharm Inc.) de FSH na superovulação de fêmeas da espécie bovina é observada a extrema limitação dos sistemas de expressão utilizados (SOERS e cols., 1979).

Considerando o alto custo do FSH purificado parcialmente a partir da hipófise suína, que é comercializado a um valor médio de 60 dólares a dose, o que acarreta um gasto superior a US\$ 2,5 milhões por ano com a importação do produto, uma composição de hormônio recombinante com a mistura de FSH com activina A, que potencia o efeito do FSH, diminuirá a dose necessária, barateando significativamente o custo por dose. Neste intuito, este trabalho propõe colaborar com algumas etapas desta proposta, para que futuramente seja possível o desenvolvimento e uso de hormônios recombinantes que apresentem funções sinérgicas no processo de superovulação. Estas etapas consistem em expressar a activina A humana recombinante em levedura *Pichia pastoris*, que produz proteínas glicosiladas mais próximas à proteína nativa e secreta a mesma em meio de cultura, facilitando a purificação. Como sistema fermentador será utilizado biorreatores para controle de pH, oxigenação, metanol, nutriente e temperatura, como também para maximizar a produção da proteína. A segunda etapa, propõe-se purificar a proteína por cromatografia líquida de filtração em BioGel P-30 e avaliar a atividade biológica da proteína produzida em mamíferos.

## 2 OBJETIVOS

- Expressar a activina A humana *recombinante* em levedura *Pichia pastoris*, um sistema eucarioto promissor e ainda não descrito para esta proteína,
- Purificar a proteína recombinante por cromatografia líquida de filtração em Biogel P-30 em sistema FPLC.
- Verificar a atividade biológica da proteína bruta e purificada, através da indução maturacional de folículos ovarianos em um modelo mamífero.

## **3 MÉTODO**

### **3.1 MATERIAIS**

#### **3.1.1 Leveduras**

Para a expressão utilizou-se levedura *Pichia pastoris* (linhagem SMD 1165) já transformada com plasmídeo pPIC9 contendo o cDNA da activina. Este plasmídeo foi fornecido pelo laboratório de animais transgênicos e proteínas recombinantes da Universidade de Mogi das Cruzes. O plasmídeo transformado de activina foi denominado pACT (anexo A).

#### **3.1.2 Animais**

Foram usados neste estudo ratas Wistar no estágio da peripuberdade (ZAPATERO-CABALLERO *e cols.*, 2004). As ratas utilizadas apresentavam, no início do tratamento, idade de 31 a 34 dias e massa corpórea de 55 a 100 g. Esses animais foram fornecidos pelo biotério da Universidade de Mogi das Cruzes.

#### **3.1.3 Colunas e reagentes**

- Coluna de gel filtração Biogel P-30 (1 x 60 cm) - (Amersham Biosciences);

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e de procedência Sigma, Merck, Invitrogen, Synth, USB.

#### **3.1.4 Anticorpos**

- Anticorpo anti-activina A comercial – R & D Systems, Inc.

#### **3.1.5 Equipamentos utilizados**

- Autoclave linha SD, Phoenix;
- Balanças AS 1000C Marte e Adventurer OHAUS;
- Bioreator BioFlo® 110 Benchtop Fermentor
- Centrífugas 5810R e MiniSpin, Eppendorf;
- Cuba de eletroforese, Biometra;

- Espectrofotômetros Femto, modelo 800XI e Titertek Multiscan;
- Estufa Quimis Q-316 M2
- Fonte de eletroforese 300, BioAgency;
- Homogeneizador básico Ultra Turrax IKAT 18;
- Incubadora Refrigerada Ma 830/a
- Microscópico óptico Nikon
- Osmose reversa e deionizador de água Millipore Milli Q Academic B8EM23173A;
- pHmetro básico Occumet AB15, Fisher Scientific;
- Sistema FPLC, Pharmacia Biotech
- Sistema Hollow-Fiber (Amersham/GE Healthcare).
- Termomixer 5436, Eppendorf;

## 3.2 PROCEDIMENTOS

### 3.2.1 Expressão em sistema fermentador

#### 3.2.1.1 Pré-inóculo

Amostras de *Pichia pastoris* transformadas foram repicadas em placas do meio de cultura sólido YPD (anexo B). Após 72 horas, as colônias foram transferidas para 300 mL de meio líquido MGY (anexo B) em frasco erlenmayer de 2 L, para dar continuidade ao crescimento em incubadora a 30° C com agitação a 200 rotações por minuto (rpm) até atingir DO<sub>600</sub> (densidade ótica 600) entre 2 e 6, indicando que as leveduras alcançaram a fase *log* de crescimento.

#### 3.2.1.2 Passagem do pré-inóculo para o biorreator

Os meios de cultura e soluções utilizados no biorreator estão descritos no anexo B. Preparou-se 3 litros de meio contendo glicerol + sais. Este meio foi colocado no biorreator e ambos foram esterilizados em autoclave. As leveduras que cresceram em meio MGY foram transferidas para o biorreator contendo o meio glicerol + sais esterilizado. Todo o sistema foi submetido a temperatura de 30° C sob agitação de 500 rpm. Nesta etapa foi adicionado PTM1 (4,4 mL/L) e iniciou-se o processo de crescimento da massa. Quando todo glicerol havia sido consumido, novo glicerol 50 % + PTM1 foi adicionado em fluxo constante de 1 mL/min. Após a massa úmida atingir 200 g/L a adição de glicerol 50% + PTM1 foi interrompida e passou-se ao processo de indução da expressão da proteína pela adição de metanol.

### **3.2.1.3 Fase da indução**

Durante as primeiras 24 horas foi adicionado metanol + PTM1 em fluxo de 2 mL/H/L. Após 24 o fluxo de metanol + PTM1 foi elevado para 3 mL/H/L permanecendo com este fluxo até as 72 horas quando terminou a fermentação.

## **3.2.2 Separação e concentração da proteína**

### **3.2.2.1 Sistema hollow-fiber**

Após expressão da proteína em biorreator, o fermentado foi centrifugado a 5° C sob 9000 rpm e as leveduras foram descartadas. O sobrenadante foi transferido para um sistema hollow-fiber (Amersham/GE Healthcare), para concentração e diálise contra salina. Para concentração da proteína utilizou-se membrana permeável de 5 kDa. O produto concentrado foi dialisado com salina (NaCl 0,9 %), utilizando a mesma membrana de 5 kDa.

## **3.2.3 Estimativa da concentração protéica**

Após sistema hollow-fiber, a concentração de proteína na amostra foi estimada utilizando-se o método coomassie, proposto por Bradford (1976). Uma curva foi construída com padrões contendo 0, 1, 2, 5 e 10 µg de soroalbumina bovina (BSA). Sobre a amostra e os padrões foi adicionado água para normalizar o volume a 200 µL e em seguida 1 mL de reagente de cor coomassie blue G-250 (Proteoquant - Proteobrás). A mistura foi agitada (em vórtex) e após 20 minutos se procedia à leitura da absorbância a 595 nm. As soluções utilizadas para estimativa da concentração protéica estão descritas no anexo VI

## **3.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Todas as soluções utilizadas para eletroforese em gel de poliacrilamida estão descritas no anexo VII. Inicialmente o gel de poliacrilamida 12,5% (p/v) foi submetido à pré-corrída por 30 minutos a 60 V. As amostras foram aquecidas em banho seco a 95 °C por 5 minutos, centrifugadas e aplicadas no gel. Iniciou a corrida eletroforética, sob tensão de 120 V, e uma corrente de 30 mA. As massas moleculares das bandas das amostras foram determinadas por comparação de seus fatores de migração com de proteínas de massas moleculares conhecidas padrão (Bench Mark Protein Ladder, Life Technologies, com tamanhos de 10 a 200 kDa). Os géis foram revelados pelo método de coloração por prata.

#### 3.2.4.1 Coloração pela prata

O gel foi fixado previamente durante 30 min sob agitação em solução contendo metanol 50% (v/v) e ácido acético 12% (v/v). Em seguida o gel foi lavado 4 vezes com água destilada sob agitação por 5 min cada vez. Posteriormente, adicionou-se solução de nitrato de prata 0,2% (p/v) e o gel deixado nesta solução durante 30 minutos. O gel foi novamente lavado com água destilada 2 vezes por 5 minutos para retirada do excesso de solução. Para revelação adicionou-se o gel em 100 mL de solução de carbonato de sódio 3% (p/v) contendo 50 µL de formaldeído 37% (v/v) até o aparecimento das bandas. A reação de coloração foi interrompida pela adição de ácido acético 1% (v/v).

#### 3.2.5 Eletrotransferência e imunoblote

As soluções utilizadas no Western blot estão descritas no anexo VIII. A corrida eletroforética foi efetuada a temperatura ambiente, com o tampão de corrida (Tris-HCl 120 mM contendo SDS 17 mM e glicina 93 mM) e tensão constante de 100 volts durante duas horas. Após a corrida, foi realizada a transferência de proteínas para a membrana de nitrocelulose Hybond-C (Amersham Pharmacia Biotech), a 20 mA, pernoite, sendo a amperagem duplicada na última hora. Depois da transferência o padrão de massa molecular pré-corado (BIO-RAD) foi recortado, para não alterar sua cor, durante reação com anticorpo específico para activina.

A membrana foi incubada com tampão fosfato de sódio 35 mM contendo 150 mM de NaCl (PBS) e Tween-20 0,3% (PBST) por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas três lavagens com PBST (Tween 0,05%) de 5 minutos cada, sob agitação. Após as lavagens a membrana foi incubada com anticorpo anti-activina A comercial, por duas horas, à temperatura ambiente. Novamente a membrana foi lavada por três vezes com PBST e incubada com anti-IgG de coelho conjugada à peroxidase, por uma hora a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida a membrana foi lavada novamente três vezes com PBST, e duas lavagens com PBS. A revelação foi realizada com diaminobenzidina 0,05%, cloronaftol 0,025% (p/v) e peróxido de hidrogênio a 0,0125% (v/v).

#### 3.2.6 Cromatografia líquida

O modo de preparo dos tampões e solventes utilizados para a cromatografia desse trabalho está descrito no anexo IX.

### 3.2.6.1 Cromatografia de filtração em gel

Vinte miligramas de proteína do fermentado bruto de um dos clones que apresentou a banda de interesse foram aplicados em coluna de filtração em Biogel P-30 (1 x 60 cm), previamente equilibrada e eluída em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, em fluxo de 1 mL/min. Foram coletadas frações de 1 mL por tudo e a eluição das proteínas foi monitorada pela leitura da absorbância a 280 nm.

### 3.2.7 Atividade biológica

Para análise biológica, a proteína bruta e purificada (rACT), foram injetadas (via intraperitoneal) em ratas Wistar, em dosagens diferentes para cada grupo, durante três dias de tratamento. Como controle foi injetado igual volume de solução salina (NaCl 0,9%). Foram avaliados quatro grupos tratados com rACT *bruta* e três grupos tratados com rACT *purificada*, com os respectivos controles para cada grupo. As doses aplicadas nos grupos de rACT *bruta* foram: 50 µg (n = 9 tratados e n = 9 controle), 35 µg (n = 8 tratados e n = 7 controle), 30 µg (n = 4 tratados e n = 4 controle) e 25 µg (n = 7 tratados e n = 7 controle) e para os grupos de rACT: 1 µg (n = 6 tratados e n = 4 controle), 0,5 µg (n = 5 tratados e n = 4 controles) e 0,1 µg (n = 5 tratados e n = 5 controle).

Após o término do tratamento, as ratas foram pesadas, os ovários foram extraídos e pesados. A média do peso entre os ovários de cada rata foram calculados, os efeitos do tratamento sobre o desenvolvimento dos ovários foram avaliados medindo-se o peso dos ovários (média entre os ovários) em relação ao peso corporal do animal (P. C.). O valor obtido foi multiplicado por 100, para determinar o peso relativo (P. R.) expresso em termos percentuais. O P. R. (%) foi submetido a análise estatística.

### 3.2.8 Análise histológica

Foram selecionados um ovário de cada grupo tratado com activina e um de cada grupo controle para análise histológica. Foram estabelecidos os seguintes critérios para a seleção dos ovários: no grupo um foi selecionado o ovário de maior peso, no grupo dois o de menor peso e assim sucessivamente, tanto nos grupos tratados com activina, quanto nos grupos tratados com salina. Até o momento da montagem das lâminas os ovários foram conservados em formaldeído 10%. As lâminas foram preparadas pela empresa Histotech Ltda, que empregou o protocolo de coloração pela técnica H/E, conforme descrito no anexo X. A análise dos ovários

foi efetuada sob orientação dos professores de histologia João Carlos Rainho e Ingrid Perone, da Universidade de Mogi das Cruzes.

As lâminas foram visualizadas por microscopia óptica em um aumento de 40x para o campo inteiro da lâmina e um aumento de 100x para a visualização dos detalhes. Na análise histológica foi observado o grau de maturação dos folículos ovarianos, comparando a lâmina do ovário tratado com a activina com a lâmina do ovário controle (salina) e assim sucessivamente.

### **3.2.9 Análise estatística**

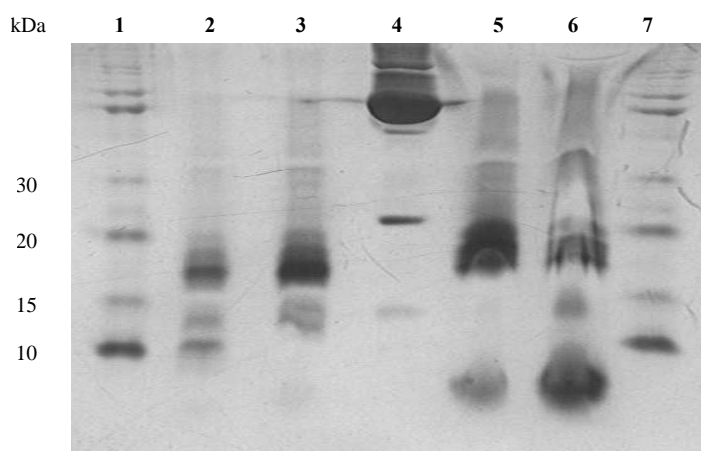
Os pesos relativos (%) de cada grupo tratado com activina (rACT) foi comparado com seu respectivo controle, através do teste t de *student* (programa GraphPad Prism versão 4.03-2005) e são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de cada grupo de animais. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.



## 4 RESULTADOS

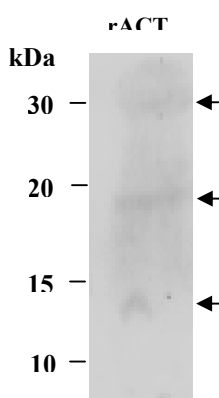
### 4.1 EXPRESSÃO

Para a obtenção do fermentado com a proteína recombinante, três principais etapas foram necessárias: pré-inóculo, obtenção de biomassa no biorreator e fase da indução com metanol. No biorreator, após 48 horas com alimentação a base de glicerol, o fermentado atingiu a biomassa úmida de 208 g/L. Neste momento interrompeu-se a adição de glicerol, e após 4 horas, tempo necessário para que o glicerol se esgotasse, iniciou-se o processo de indução pela adição de metanol. O processo de indução prolongou-se por 72 horas. Após processo de indução, as leveduras foram separadas do sobrenadante e o conteúdo protéico submetido a processo de concentração em sistema hollow-fiber. Por este sistema, a amostra é passada através de uma membrana filtrante diversas vezes, sendo que a cada vez o volume é reduzido pela separação de substâncias de baixa massa molecular, incluindo o solvente, da proteína recombinante que fica retida no sistema. Desta forma, ao mesmo tempo que a concentração de proteína da amostra aumenta, pode-se submetê-la a diálise, pela retirada de sais indesejáveis. O processo pode ser repetido quantas vezes for necessário. Após concentração e diálise, o conteúdo protéico foi estimado e amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12,5 % para verificação dos níveis de expressão e grau de pureza da proteína. Uma amostra contendo 1 µg de activina comercial (RD Systems) também foi aplicada no gel para comparação. O resultado está apresentado na figura 4. A figura 4 mostra que a cepa selecionada é capaz de expressar uma proteína de massa molecular em torno de 13 kDa (canaletas 2, 3 e 6). Na canaleta 4 foi aplicado a activina comercial, onde pode-se ver a banda de 13 kDa fraca, uma outra de aproximadamente 23 kDa, e uma intensa de alta massa, provavelmente albumina que acompanha o padrão comercial. Duas outras bandas com massas moleculares que variam de 17 a 19 kDa aparecem com alta intensidade no nosso produto, e que aumentam proporcionalmente quando se aplica no gel maiores quantidades de proteína. Os produtos de degradação da activina, menores que 10 kDa, podem ser vistos nas canaletas 3, 5 e 6. Parece-nos que as bandas de 17 a 19 kDa resultam da associação do(s) produto(s) de degradação (menores que 10 kDa) e a própria activina, pois na canaleta 5, onde foi aplicado 50 µg de proteína, a banda referente à activina desaparece.



**Figura 4.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 % do produto obtido após fermentação mostrando os níveis de expressão de activina. Canaleta 1, marcador de massa molecular BenchMark Protein Ladder; canaletas 2 e 3, 10 e 20 µg rACT; canaleta 4, 1 µg activina comercial (RD Systems); canaletas 5 e 6, 50 e 100 µg rACT; canaleta 7, marcador de massa molecular.

Após passagem da rACT por hollow-fiber, uma amostra foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida e transferida para membrana de nylon para reação de imunoblote. Após transferência, a membrana foi colocada na presença de anticorpo comercial (RD Systems) específico para activina. O resultado está mostrado na figura 5 abaixo.



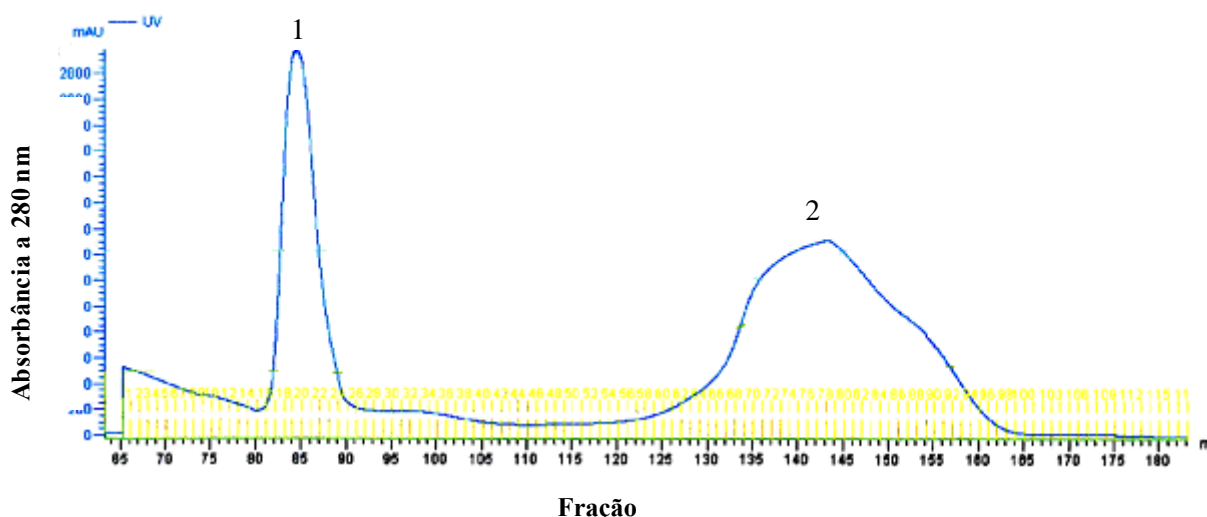
**Figura 5.** Imunotransferência do produto obtido na fermentação de cepa transformada com pACT utilizando-se anticorpo anti-activina (RD Systems). As setas indicam as bandas imunoreativas.

O anticorpo anti-activina comercial foi capaz de reconhecer três bandas na nossa amostra, uma de 13 kDa, outra em torno dos 18 kDa e outra de 30 kDa (figura 5).

Provavelmente a banda de 30 kDa refere-se ao dímero, e a de 18 kDa de agregado envolvendo a rACT com algum peptídeo menor, provavelmente algum fragmento de degradação da própria rACT.

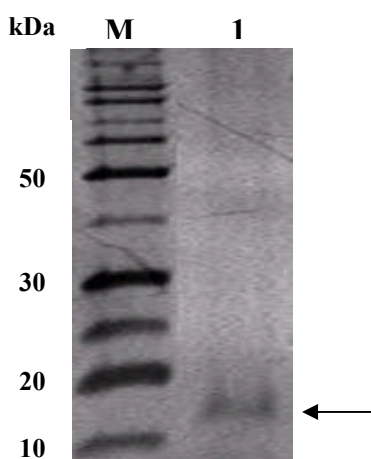
## 4.2 PURIFICAÇÃO

A purificação da proteína foi executada por cromatografia líquida em sistema FPLC, utilizando coluna Biogel P-30 à temperatura ambiente. Vinte miligramas de proteína do material proveniente do hollow-fiber foram aplicados na coluna cromatográfica e a coluna foi eluída com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0, em fluxo de 1 mL/min. Foram coletadas frações de 1 mL que foram monitoradas a 280 nm. Nesta cromatografia foram obtidos 2 picos de proteína como pode ser observado na figura 6.



**Figura 6.** Cromatografia de filtração em gel. Perfil da eluição da activina bruta recombinante (rACT) em coluna de Biogel P-30 (1 x 60 cm). O gel foi equilibrado e eluído com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0. A eluição foi monitorada pela leitura da absorbância a 280 nm (uv).

Os volumes das frações correspondentes aos dois picos foram juntados resultando em volume de 5 mL (“pool”) para o pico 1 e 20 mL para o pico 2, cujas concentrações de proteínas foram estimadas em 0,96 mg/mL para o pico 1 e 0,5 mg/mL para o pico 2. A concentração de proteína dos volumes resultantes foi estimada utilizando-se o método descrito por Bradford (1976). Uma pequena amostra, contendo 1 µg de proteína de cada *pool*, foi aplicada em eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 % para verificar o grau de pureza. O gel foi corado com nitrato de prata e o resultado está apresentado na figura 7.



**Figura 7.** Eletroforese em gel de poliacrilamida da rACT eluída na cromatografia de filtração em gel. Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 12,5 % com SDS corado com prata, de 1 µg do pool obtido a partir do pico 1 da cromatografia em Biogel P-30.

A eletroforese mostrou que a activina eluiu no pico 1 da cromatografia de filtração em gel, pois como pode ser visto pela figura 7 esta amostra apresentou somente uma banda de 13 kDa, massa molecular esperada para a rACT (indicada pela seta). O pico 2 não apresentou qualquer banda de proteína (dados não mostrados) o que sugere que esta amostra seja constituída principalmente por sais.

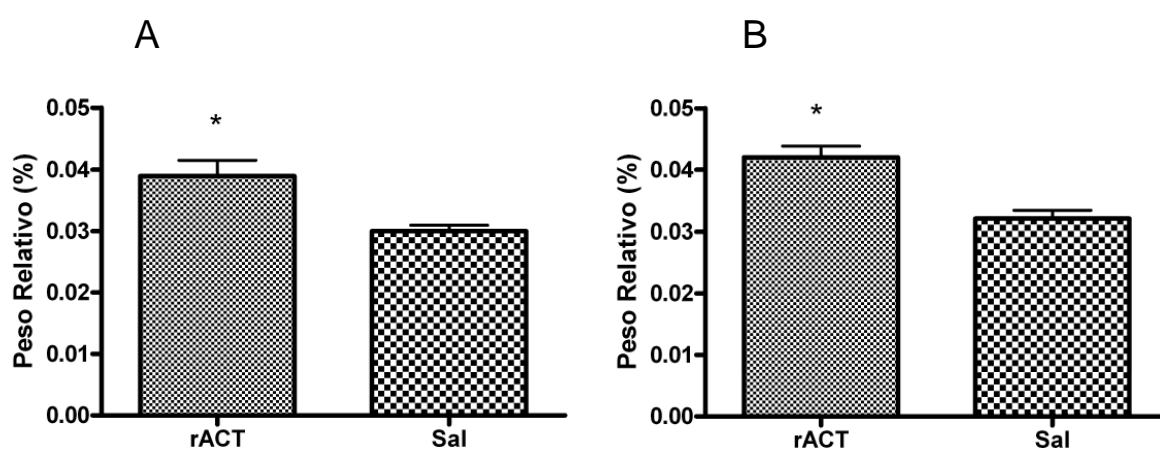
### 4.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA

Amostras do fermentado bruto, submetido somente a concentração e diálise em sistema hollow-fiber e amostras do *pool* do pico 1 da cromatografia em filtração em gel, foram utilizadas para teste biológico para verificar a possível atividade da proteína recombinante. Para isso utilizamos o teste no qual a proteína é injetada em ratas Wistar no estágio da peripuberdade (ZAPATERO-CABALLERO *e cols.*, 2004), por três dias e após este período as ratas foram sacrificadas e as massas ovarianas dos grupos tratados e controles foram determinadas.

#### 4.3.1 Massa dos ovários

Foram estabelecidos 7 grupos de animais, nos quais foram injetadas doses da proteína recombinante *bruta* que variaram de 25 a 50 µg por dia por animal e doses de 1, 0,5 e 0,1 µg da proteína *purificada*. A figura 8 mostra os resultados obtidos com a *maior* dose de proteína

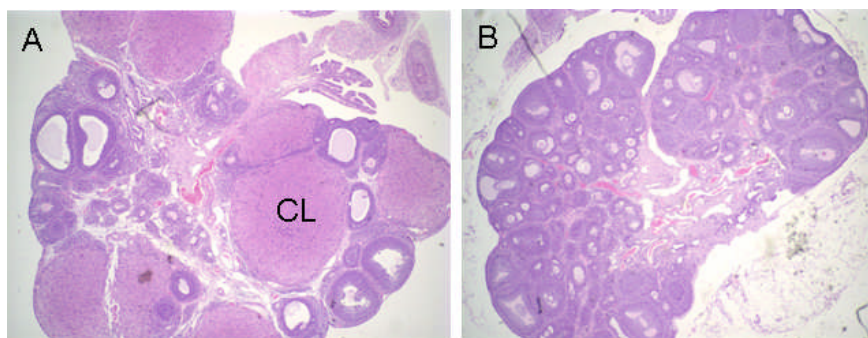
bruta, 50  $\mu\text{g}$  (figura 8 A) em comparação com a *menor* dose da proteína purificada, 0,1  $\mu\text{g}$  (figura 8 B). Por esta figura podemos observar que os resultados obtidos com a dose de 0,1  $\mu\text{g}$  da proteína purificada foram semelhantes aos obtidos com a maior dose da proteína bruta ( $0,038 \pm 0,0018$  vs  $0,043 \pm 0,0013$ ). Entretanto, quando se compara a massa relativa de ambos ovários tratados com a massa relativa dos respectivos controles, observamos aumento da massa do ovário tratado. O peso elevado dos ovários foi evidenciado em todos os grupos tratados. Sabendo que a activina A estimula o desenvolvimento e crescimentos dos folículos ovarianos, o peso elevado dos ovários tratados com rACT fornece evidências de que a proteína esteja biologicamente ativa.



**Figura 8.** Comparação entre o efeito obtido com a maior dose (50  $\mu\text{g}$ ) da proteína recombinante bruta (A) e da menor dose (0,1  $\mu\text{g}$ ) da proteína purificada (B), sobre o peso dos ovários de ratas Wistar. rACT = activina recombinante. Sal = salina. \*  $p < 0,05$  versus controle.

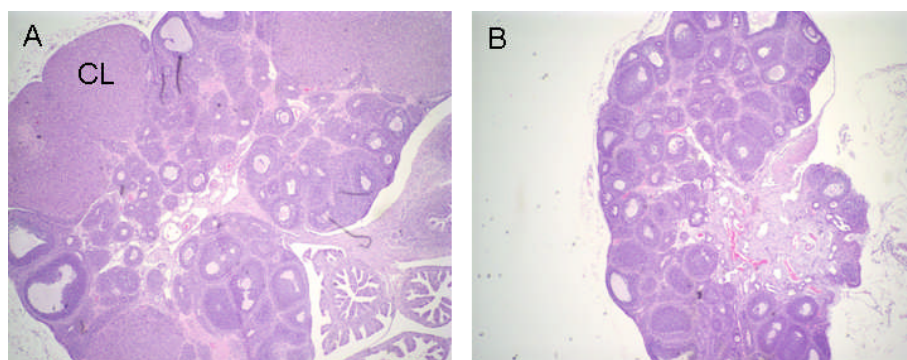
#### 4.3.2 Análise histológica

Amostras de alguns ovários provenientes das ratas tratadas foram submetidas a análise histológica. A figura 9 mostra a fotografia de dois cortes histológicos de ovários obtidos do grupo tratado com 50  $\mu\text{g}$  da proteína bruta por dia por animal (figura 9 A) e do respectivo grupo controle, tratado com salina (figura 9 B). Sabendo que a activina A induz os folículos ovarianos ao rápido crescimento, desenvolvimento e ovulação prematura, pode-se observar que a atividade biológica da proteína foi mais uma vez confirmada. Como pode-se observar na figura 10, no grupo tratado com salina aparecem diversos folículos em desenvolvimento, enquanto que no grupo tratado com a proteína recombinante observamos a presença de corpos lúteos, indicando que já ocorreu ovulação destes folículos.



**Figura 9.** Fotografia de corte histológico de ovário de rata tratada com a proteína recombinante bruta na dose 50  $\mu\text{g}$  por dia (A) ou com salina (B). CL = corpo lúteo.

O efeito do tratamento com dose 0,1  $\mu\text{g}$  da proteína purificada por dia por animal, sobre o amadurecimento folicular é apresentado na figura 10.



**Figura 10.** Fotografia de corte histológico de ovário de rata tratada com a proteína recombinante purificada na dose 0,1  $\mu\text{g}$  por dia (A) ou com salina (B). CL = corpo lúteo.

Como observado no experimento anterior, o ovário de rata tratada com salina apresentou diversos folículos em desenvolvimento (figura 10 B), enquanto que o ovário de rata tratada com a proteína recombinante apresentou corpos lúteos (figura 10 A), mostrando que a proteína recombinante apresenta capacidade de interferir no amadurecimento folicular mesmo quando administrada em doses relativamente pequenas, submicromolar.

## 5 DISCUSSÃO

O trabalho aqui apresentado foi conduzido em três etapas distintas. A primeira representada pela expressão, a segunda pela purificação da activina A humana recombinante e a terceira pela verificação da atividade biológica da proteína produzida.

Para expressar a activina A humana recombinante foi escolhido o sistema de expressão em levedura *Pichia pastoris*. Até a data atual não existe na literatura, qualquer informação a respeito da utilização deste sistema para expressão desta proteína.

*Pichia pastoris* representa um sistema de expressão bem sucedido para a produção de uma variedade de proteínas heterólogas (CEREGHINO *e cols.*, 2002; CREGG, *e cols.*, 2000). A eficiência deste sistema pode ser atribuída a diversos fatores, como: a *habilidade* da *P. pastoris* em produzir intracelularmente ou extracelularmente proteínas heterólogas em níveis elevados; a *potencialidade* de executar modificações pós-traducionais eucarióticas como, por exemplo, a glicosilação, a formação de ligações dissulfeto e processamento proteolítico; a *simplicidade* das técnicas necessárias para a manipulação genética molecular da *P. pastoris* e o *custo baixo e disponibilidade comercial* deste sistema de expressão (CEREGHINO E CREGG, 2000).

Através do sistema de expressão *Pichia pastoris*, foi possível controlar os níveis de expressão de activina A produzida, através da indução por metanol. Este sistema de expressão utiliza o promotor AOX1, que controla o gene que codifica a expressão da oxidase do álcool (AOX), e que é fortemente induzido por metanol. A oxidase do álcool é a enzima que catalisa a primeira etapa metabólica da oxidação do metanol nos peroxissomos (CEREGHINO *e cols.*, 2006). Através deste promotor, pode-se controlar o nível de transcrição da proteína por indução com metanol, o que permite a produção de quantidades elevadas da proteína alvo (CEREGHINO E CREGG, 2000). A taxa de metanol adicionada ao meio de cultura para a expressão da proteína foi ajustada com a utilização de biorreatores, de maneira que o metanol adicionado seja apenas para a síntese da proteína, impedindo adição adicional que possa causar toxicidade (CREGG *e cols.*, 2000; DALY E HEARN, 2005; HELLWING *e cols.*, 2001; MACAULEY-PATRICK *e cols.*, 2005). Desta forma, a utilização de biorreatores permite que os níveis de expressão da proteína sejam maximizados. O cultivo da *P. pastoris* em incubadora pode gerar muitos problemas, incluindo o *controle do pH*, limitação do oxigênio e limitação do nutriente. Já o bioreator permite que níveis dissolvidos do oxigênio sejam elevados, não apenas por agitação, mas por controle do fluxo de entrada, podendo este ser suplementado com fluxo de ar ou de oxigênio puro, ou fazendo os dois em série ou

simultaneamente. O problema da *limitação do nutriente* pode também ser minimizado com o bombeamento destes em uma taxa que seja capaz de reabastecer na mesma velocidade do consumo. Nas incubadoras o crescimento das células está limitado pelos nutrientes. Em biorreator o pH pode ser ajustado, garantindo assim a inibição das atividades das proteinases que existem no meio da cultura durante a fase da produção. O pH 5 é o ideal para o crescimento e metabolismo da *P. pastoris*, pois a taxa do consumo do oxigênio é mais elevada nesse pH e a temperatura mais adequada para a produção da proteína em *P. pastoris* ocorre em 30°C e cessa em 32°C (DALY E HEARN, 2005; CREGG *e cols.*, 2000; HELLWING *e cols.*, 2001; MACAULEY-PATRICK *e cols.*, 2005). Neste trabalho o protocolo do sistema fermentador utilizado para expressão foi baseado em estudos desenvolvidos por Cereghino e Cregg (2000), Cregg *e cols.*, (2000) e os resultados obtidos com a expressão mostraram-se eficazes.

Para concentração da proteína utilizou-se o sistema hollow-fiber. Um protocolo semelhante foi empregado por Pangas e Woodruff, (2002) durante a purificação da inibina e activina A. A diálise contra salina, realizada nesta etapa, facilitou a purificação em cromatografia de filtração em gel.

Na segunda etapa deste trabalho a activina A recombinante foi purificada por cromatografia de filtração em Biogel P-30 em sistema FPLC. Para purificação da activina A, Pangas e Woodruff (2002), utilizaram cromatografia de afinidade. Nesta pesquisa optou-se por empregar cromatografia de gel filtração, pois o produto obtido após separação e concentração do fermentado no hollow-fiber já apresentava bom grau de pureza, constatado no gel de poliácridamida 12,5%. O sistema *Pichia pastoris* oferece vantagens em termos de purificação, pois secreta a proteína em meio de cultura. Esta secreção ocorre pela presença do peptídeo sinal da *S. cerevisiae* (inserido no vetor plasmidial), que direciona a proteína para a via secretória. Nesta via, a proteína irá adquirir sua conformação correta e receberá modificações pós-traducionais como: glicosilação, formação de ligações dissulfeto e processamento proteolítico, de modo a garantir a funcionalidade da proteína secretada. Na cromatografia foi utilizada a coluna Biogel P-30, que apresenta corte de massa molecular entre 2,5 kDa a 40 kDa. O resultado desta cromatografia originou dois picos e dois vales. Conforme a eletroforese de poliácridamida 12,5%, foi possível confirmar que a activina A eluiu no pico 1 da cromatografia de filtração em gel.

A terceira etapa deste trabalho foi destinada a testar a atividade biológica da proteína produzida. Doses variadas de activina. A recombinante *bruta e purificada* foram testadas em sete grupos de ratas Wistar, durante três dias de tratamentos. Foi observado, em todos os



grupos tratados com a proteína bruta e purificada, uma elevação estatisticamente significativa do peso ovariano. Sabendo que a activina A estimula o desenvolvimento, crescimento e maturação dos folículos ovarianos, o peso elevado dos ovários tratados, fornece evidência de que a proteína está ativa. Sugere-se que a elevação do peso do ovário seja consequência do acúmulo de líquido folicular no processo de maturação. À medida que o folículo cresce, principalmente pelo aumento do número de células da granulosa, surgem acúmulos de líquidos entre essas células. As cavidades contendo líquidos confluem e acaba formando uma cavidade única, o antro folicular. As células da granulosa se rearranjam de tal modo que o ovócito primário passa a ser circundado por um pequeno grupo destas células que se projetam de fora da parede para dentro do antro preenchido por fluido. Esta estrutura é conhecida como *cumulus oophorus*. Alguns folículos continuam a proliferação das células da granulosa e aumento do líquido folicular resultando na formação de um folículo maduro ou de Graaf. A formação contínua do líquido folicular leva o *cumulus oophorus* a se destacar de sua base para flutuar livremente dentro do fluido folicular. O processo envolvendo a ruptura do folículo maduro e liberação do óvulo é denominado ovulação. Todo este processo de foliculogênese é mediado principalmente por hormônios gonadotrópicos e por fatores locais de crescimento e desenvolvimento como por exemplo membros da TGF- $\beta$ , que participam da regulação autócrina e parácrina destes eventos (HIRSHFIELD, 1991; HIRSHFIELD, 1985; RICHARDS, 2002). A activina A é um dos fatores de crescimento que regulam o processo de foliculogênese. A elevação do peso ovariano, após tratamento com activina A foi constatada em muitas pesquisas com roedores e evidencia o papel autócrino e parácrino da activina A no desenvolvimento estrutural e funcional dos folículos durante a foliculogênese (HIRSHFIELD E MIDGLEY, 1978; RICHARDS, 2002). A análise histológica fornece mais uma evidência de que a proteína está ativa e vêm de acordo com os resultados obtidos nos testes anteriores. Na análise histológica foi possível constatar a presença de corpos lúteos, indicativo de que já ocorreu a ovulação, pois após a ovulação o restante do folículo maduro se colapsa, vasos sanguíneos se rompem e extravasam sangue para dentro da cavidade folicular, formando um corpo hemorrágico que é convertido em corpo lúteo (HIRSHFIELD, 1985). A ovulação prematura em ratas após tratamento com activina A, já foi constatada em outras pesquisas. Resultados semelhantes aos nossos foram obtidos por Erickson *e cols.*, (1995), os quais mostraram através de estudos histológicos, que após três dias de tratamento com activina A humana recombinante, alguns folículos iniciaram a ovulação prematura e outros folículos após a ovulação desenvolveram corpos lúteos. Nenhuma ovulação foi encontrada no controle.

O mecanismo pelo qual activina A promove ovulação prematura é desconhecido. Há duas hipóteses para explicar este evento. A *primeira hipótese* seria de que a ovulação prematura ocorra, devido a capacidade que a activina tem em aumentar a expressão do FSH e LH durante a foliculogênese. Ying e Greep (1971) mostraram que alguns folículos grandes podem ser induzidos à ovulação, injetando doses farmacológicas de FSH e LH.

A principal função desempenhada por FSH no processo de foliculogênese é a estimular o desenvolvimento e crescimento dos folículos, estimular a produção de estrogênio pelo folículo (aromatase nas células da granulosa) e estimular a expansão do *cumulus* e maturação dos ovócitos. O promotor da cadeia beta do FSH (cadeia responsável pela atividade biológica específica) é regulado principalmente pela activina. A meia-vida de FSH é curta. A habilidade de ativar a transcrição do gene de FSH cadeia beta, confere um papel chave à activina A na expressão do FSH (BURGER *e cols.*, 2004; CORRIGAN *e cols.*, 1991; CARROL *e cols.*, 1989; DEMURA *e cols.*, 1996; DÓI, 1992; EITHER E FINDLAY, 2001; GAJEWSKA *e cols.*, 2002; GREGORY *e cols.*, 2005; LAMBA *e cols.*, 2005; ROBERTS *e cols.*, 1989; WEISS *e cols.*, 1995). Além de aumentar a expressão de FSH em meio de cultura, foi constatado por Li *e cols.*, (1995), que a activina A mantém os receptores de FSH funcionando na ausência deste. Via expressão de FSH, a activina também promove aumento na expressão do LH. Dados recentes também levantam a possibilidade de que a activina, em certas circunstâncias, podem também regular a produção de LH, modificando a expressão da subunidade beta de LH (COSS *e cols.*, 2005; YAMADA *e cols.*, 2004). As principais funções desempenhadas por LH na foliculogênese são a produção de androgênios nas células da Teca, que serão convertidos em estrogênios nas células da granulosa sob a ação de FSH, a maturação final dos folículos ovarianos que culmina com a ovulação, seguida com a liberação do ovócito pelo folículo, a formação do corpo lúteo e síntese de progesterona. Em células da granulosa, a activina A aumenta a formação de receptores para LH. (ERICKSON *e cols.*, 1995; DÓI *e cols.*, 1991). O aumento dos níveis de FSH e LH pela activina A, segundo Erickson (1995), poderia explicar a superovulação prematura observadas em roedores em experimentos *in vivo*. *Outra hipótese* seria de que a prematura superovulação causada pela indução com activina A seja consequência *direta* deste fator de crescimento dentro dos folículos em formação (ERICKSON *e cols.*, 1995; DÓI *e cols.*, 1991). Foi demonstrado por Dói *e cols.* (1991), em experimentos *in vivo*, que a administração sistêmica de activina A em ratas hipofisectomizadas, promove crescimento dos folículos pequenos aos estágios maiores de crescimento, indicando que nesse mecanismo não envolve FSH e que a activina A age diretamente no ovário, promovendo o desenvolvimento folicular e aumento da produção de

estradiol. Esse estudo evidenciou que a que a activina A não age somente no nível pituitário, mas também ao nível ovariano. A habilidade dos folículos em produzir e responder à activina em diversos estudos *in vivo* e *in vitro* caracteriza a regulação parácrina e autócrina da activina A no processo de foliculogênese. Em estudos *in vitro*, Li *e cols.* (1995), relataram que a activina A humana recombinante estimulou a proliferação da célula da granulosa e que na presença de FSH estas células se reagregaram em torno de cada ovócito, formando uma única camada completa de células, adquirindo características morfológicas do complexo *cumulus*. Este complexo continuou o seu desenvolvimento até formação de folículos como estruturas maduras. Estes resultados sugerem que o activina A, não é somente um mitógeno para as células da granulosa, e sim um fator que desempenha um papel importante em regular a integridade e o desenvolvimento funcionais de células da granulosa no folículo ovariano. Li *e cols.* (1995) também demonstraram, em experimentos *in vivo*, que a injeção de FSH estimulou a proliferação da célula da granulosa em ratas hipofisectomizadas. Entretanto, FSH sozinho não foi capaz de causar a proliferação significativa das células *in vitro*. O efeito do FSH no crescimento do folículo *in vivo* parece não ser direto, mas *mediado* por fatores ovarianos parácrino e autócrino do crescimento. Os estudos sugerem que este fator seja a activina A.

A injeção de FSH ou PMSG causa aumento do RNAm da activina e nos níveis da proteína em ratas hipofisectomizadas; estes níveis são simultâneos com a indução do crescimento folicular (GAJEWSKA *e cols.*, 2002; WODRUFF *e cols.*, 1992). Nos roedores, o papel preciso da activina durante o desenvolvimento folicular adiantado foi esclarecido. A activina A aumenta o tamanho dos folículos pré-antrais e promove a formação do antrum nos ratos imaturos (THOMAS *e cols.*, 2003; YOKOTA *e cols.*, 1997). No entanto, estudos relatados por Silva *e cols.* (2004) indicaram que a activina não participa somente do desenvolvimento adiantado do folículo, mas de todos os estágios do desenvolvimento folicular e durante a atividade luteal. Os transcritos da activina A, seus receptores e a folistatina são expressos em todos os estágios foliculares e no corpo lúteo. Estes dados indicam um papel regulatório da activina A, durante todo o processo de foliculogênese à atividade do luteal, como também demonstrou que a activina A é um fator importante para iniciar o crescimento dos folículos primordiais, antes mesmo do surgimento inicial de FSH, pois o crescimento inicial de células da granulosa nos folículos pequenos é independente de FSH e isso foi confirmado em ratas hipofisectomizadas (SILVA *e cols.*, 2004; XU *e cols.*, 2003).

O mecanismo específico da ação dos fatores de crescimento nos folículos ovarianos, ainda não foram totalmente elucidados, muitas pesquisas bioquímicas recentes divulgaram

sobre a sinalização dos receptores da família TGF- $\beta$  ( LAMBA *e cols.*, 2005, HARRINGTON *e cols.*, 2006; MATHEWS, 1994; SUSZKO *e cols.*, 2005; SUSZKO *e cols.*, 2003), no entanto os papéis precisos de cada membro TGF- $\beta$  na função ovariana, bem como à resposta biológica coordenada entre eles e as gonadotropinas no processo de foliculogênese, permanecem com muitas interrogações (KNIGHT E CLISTER, 2006). Muitas pesquisas nos últimos anos relataram o papel da activina A nas células da granulosa e nos folículos maiores, entretanto muitos relatórios divergem sobre os papéis específicos da activina A na foliculogênese (XU *e cols.*, 2003). No momento, de acordo com as pesquisas e referências citadas, pode-se afirmar que a activina A é apontada como um potente indutor da foliculogênese, pois estimula a expansão rápida das células da granulosa, aumenta dramaticamente a esteroidogênese, estimula a compartimentalização do folículo e maturação dos ovócitos e induz folículos grandes à prematura superovulação em mamíferos. Estes fatos vêm de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, no qual a activina A humana recombinante mostrou-se um eficiente indutor maturacional dos folículos ovarianos, bem como apresenta a capacidade de promover a ovulação prematura em mamíferos.

## 6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

- Um novo método para produção e purificação de activina A humana *recombinante* foi estabelecido.

- A proteína produzida apresentou-se biologicamente ativa, pois induziu o aumento de peso na massa ovariana em um modelo mamífero e à maturação prematura dos folículos ovarianos.

- *Pichia pastoris* constituiu um excelente sistema para expressar a activina A humana recombinante.

A produção de hormônio activina A humano *recombinante* em um sistema de expressão eficiente e economicamente viável, possibilita o emprego de novos protocolos hormonais destinados ao tratamento clínico de fertilização *in vitro* em mulheres e em protocolos de reprodução animal. Ao invés de empregar doses de FSH e LH em procedimentos como, por exemplo, em transferência de embriões (TF) e transferência intrafalopiana de gametas (GIFT), poderia ser utilizado a activina A para induzir a superovulação, ou até mesmo testar uma dose reduzida de FSH comercial com activina A. Em reprodução animal, já foram relatados estudos sobre os efeitos da activina A no processo de foliculogênese em diversos mamíferos, como gado (STOCK *e cols.*, 1997), cabra (SILVA *e cols.*, 2004), ovelha (THOMAS *e cols.*, 2003) e em primatas como o macaco *Rhesus* (ALAK *e cols.*, 1996; ALAK *e cols.*, 1998). Embora a maior parte das pesquisas referente à activina estejam destinadas à mamíferos, em outros vertebrados como peixes Zebrafish, Killifish, Goldfish e espécies de truta, o papel da activina A foi investigado na esteroidogênese e indução da maturação final do ovócito (WU *e cols.*, 2000, CALP *e cols.*, 2003; TADA *e cols.*, 2002; DIMUCCIO *e cols.*, 2005; WANG *e cols.*, 2006; CERDÁ *e cols.*, 1996) e os efeitos da activina A nestes vertebrados foram similares aos efeitos obtidos em mamíferos.

Além da aplicabilidade da activina A na área da reprodução de vertebrados, a activina A por participar de inúmeros eventos fisiológicos, poderá ser utilizada também em outros estudos envolvendo câncer, angiogênese, diferenciação de células tronco, regeneração de tecidos, sobrevivência neural, processos inflamatórios, eritropoiese e outros, de modo a oferecer uma ferramenta diagnóstica e terapêutica no tratamento de diversas doenças.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, M.H.; WOOTTON, A.N.; WILKINS, V.; HUHTANIEMI, I.; KNIGHT, P.G.; CHARLTON, H.M.; The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. **Endocrinology**. v. 141, p.1795-1803, 2000.

ALAK, B.M.; COSKUN, S.; FRIEDMAN, C.I.; KENNARD, EA.; KIM, M.H.; SEIFER, D.B. Activin A stimulates meiotic maturation of human oocytes and modulates granulosa cell steroidogenesis *in vitro*. **Fertil Steril**. v.170, p.1126–1130, 1998.

ALAK, B.M.; SMITH, G.D.; WOODRUFF, T.K.; STOUFFER, R.L.; WOLF, D.P. Enhancement of primate oocyte maturation and fertilization in vitro by inhibin A and activin A. **Fertil Steril**. v.66, p. 646- 653, 1996.

ATTISANO, L.; SILVESTRI, C.; IZZI, L.; LABBÉ, E. The transcriptional role of Smads and FAST (FoxHi) in TGF $\beta$  and activin signaling. **Mol cell Endocrinol**. v.180, p. 3-11, 2001.

ATTISANO, L.; WRANA, J.L. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. **Science**. v. 296, p.1646-1647, 2002.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr Opin Biotechnol** n.10, p. 411-421, 1999.

BARATTA, M.; WEST, L.A.; TURZILLO, A.M.; NETT ,T.M. Activin Modulates Differential Effects of Estradiol on Synthesis and Secretion of Follicle-Stimulating Hormone in Ovine Pituitary Cells. **Biol Reprod**. v. 64, p. 714-719, 2001.

BEATTIE, G.M.; LOPEZ, A.D.; BUCAY, N.; HINTON, A.; FIRPO, M.T.; KING, C.C.; HAYEK, A. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. **Stem Cells**. v. 23, p.489- 495, 2005.

BERNARD, D.J. Both SMAD2 and SMAD3 mediate activin-stimulated expression of the follicle-stimulating hormone beta subunit in mouse gonadotrope cells. **Mol Endocrinol**. v. 18, p. 606-623, 2004.

BERNARD, D.J. CHAPMAN, S.C.; WOODRUFF, T.K. An emerging role for co-receptors in inhibin signal transduction. **Mol Cell Endocrinol**. v. 180, p. 55-62, 2001.

BICHET, D.G. Posterior pituitary hormones. *Endocrinology Basic and Clinical Principles*. Totowa, New Jersey: **Human Press Inc.** p. 223, 1997.

BILEZIKJIAN, L.M.; BLOUNT, A.L.; LEAL, A.M.; DONALDSON, C.J.; FISCHER, W.H.; VALE, W.W. Autocrine/paracrine regulation of pituitary function by activin, inhibin and follistatin. **Mol Cell Endocrinol.** v. 225, p. 29-36, 2004.

BURGER, H.G.; IGARASHI, M. Inhibin: definition and nomenclature, including related substances. **Endocrinology** v.122, p.1701-1702, 1988

BURGER, L.L.; HAISENLEDER, D.J.; DALKIN, A.C.; MARSHALL, J.C. Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. **J Mol Endocrinol.** v.33, p. 559-584, 2004.

BURGUES, T. L.; KELLY, R. B. Constitutive and regulated secretion of proteins. **Ann Rev Cell Biol.** v.3, p. 243-293, 1987.

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

BRAILEANU, G.T.; ALBANESE, C.; CARD, C.; CHEDRESE, P.J. FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. **Theriogenology.** v. 49, p. 1031-1037, 1998.

BROWN, T.A. Gene cloning and DNA analysis: an introduction. **Blackwell Science Ltd.**, 2001.

CALP, M.K.; MATSUMOTO, J.A.; VAN DER, K.G. Activin and transforming growth factor-beta as local regulators of ovarian steroidogenesis in the goldfish. **Gen Comp Endocrinol.** v.132, p.142-150, 2003.

CARROLL, R.S.; CORRIGAN, A.Z.; GHARIB, S.D.; VALE, W.; CHIN, W.W.; Inhibin, activin, and follistatin: regulation of folliclestimulating hormone messenger ribonucleic acid levels. **Mol Endocrinol.** v.3, p.1969-1976, 1989.

CARROLL, R.S.; KOWASH, P.M.; LOFGREN, J.A.; SHWALL, R.H.; CHIN, W.W. In vivo regulation of PSH synthesis by inhibin and activin. **Endocrinology.** v.129, p.3299-3304, 1991.

CERDÁ, J.; CALMAN, B.G.; LAFLEUR, J.R.; G.J.; LIMESAND, S. Pattern of vitellogenesis and follicle maturational competence during the ovarian follicular cycle of *Fundulus heteroclitus*. **Gen Comp Endocrinol.** v.103, p. 24-35, 1996.

[CEREGHINO, G.P.](#); [CEREGHINO, J.L.](#); [ILGEN, C.](#); [CREGG, J.M.](#) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **[Curr Opin Biotechnol.](#)** v.13, n. 4, p.329-332, 2002.

[CEREGHINO J.L.](#), [CREGG J.M.](#) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **[Fems Microbiol Rev.](#)** v. 24, n.1, p. 45-66, 2000.

CORRIGAN, A.Z.; BILEZIKJIAN, L.M.; CARROLL, R.S.; BALD, L.N.; SCHMELZER, C.H.; FENDLY, B.M.; MASON, A.J.; CHIN, W.W.; SCHWALL, R.H.; VALE, W. Evidence for an autocrine role of activin B within rat anterior pituitary cultures. **Endocrinology.** v. 24 p.1682-1684, 1991.

COSS, D.; THACKRAY, V.G.; DENG, C.X.; MELLON, P.L. Activin regulates luteinizing hormone beta-subunit gene expression through Smad-binding and homeobox elements. **Mol Endocrinology.** v.19, p. 2610-2623, 2005.

[CREGG, J.M.](#); [CEREGHINO, J.L.](#); [SHI, J.](#); [HIGGINS, D.R.](#) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **[Mol Biotechnol.](#)** v.16, n.1, p.23-52, 2000.

CREGG, J.M.; MADDEN, K.R.; BARRING, K.J.; THILL, G.; STILLMAN, C.A. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast, *Pichia pastoris*. **Mol Cell Biol** v. 9, p.1316-1323, 1989.

[DALY, R.](#); [HEARN, M.T.](#) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **[J Mol Recognit.](#)** v.18, n.2, p. 119-138, 2005.

DIERICH, A.; SAIRAM, M.R.; MONACO, L.; FIMIA, G.M.; GANSMULLER, A.; LEMEUR, M; SASSONE-CORSI, P. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 95, p.13612-13617, 1998.

DIMUCCIO, T.; MUKAI, S.T.; CLELLAND, E.; KOHLI, G.; CUARTERO, M.; WU, T.; PENG, C. Cloning of a second form of activin-betaA cDNA and regulation of activin-betaA



subunits and activin type II receptor mRNA expression by gonadotropin in the zebrafish ovary. **Gen Comp Endocrinol.** v.143, p.287–299, 2005.

DOI, M.; IGARASHI, M.,; HASEGAWA, Y.; ETO, Y.; SHIBAI, H.; MIURA, T.; IBUKI, Y. *In vivo* action of activin-A on pituitary-gonadal system. **Endocrinology.** v.130, p.139-144, 1992.

[ERICKSON, G.F.](#); [KOKKA, S.](#); [RIVIER, C.](#) Activin causes premature superovulation. **Endocrinology.** v.136, n.11, p. 4804-13, 1995.

ETHIER, J.F.; FINDLAY, J.K. Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. **Reproduction** v.121, p.667–675, 2001.

FINDLAY, J. K. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. **Biol Reprod.** v. 48, p.15-23, 1993.

FINDLAY, J.K.; DRUMMOND, A.E.; DYSON, M.; BAILLIE, A.J.; ROBERTSON, D.M.; ETHIER, J.F. Production and actions of inhibin and activin during folliculogenesis in the rat. **Mol Cell Endocrinol.** v.180, p.139-144, 2001.

GAJEWSKA, A.; SIAWRYS, G.; BOGACKA, I.; PRZALA, J.; LERRANT, Y.; COUNIS, R.; KOCHMAN, K. *In vivo* modulation of follicle-stimulating hormone release and beta subunit gene expression by activin A and the GnRH agonist buserelin in female rats. **Brain Res Bull.** v. 58, p. 475-480, 2002.

GELLISSEN, G.; HOLLENBERG, C.P. Applications of yeast in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluveromyces lactis*. **Gene** v.190, p.87-97, 1997.

GREGORY, S.J.; LACZA, C.T.; DETZ, A.A.; XU, S.; PETRILLO.; LA E KAISER, U.B. Synergy between activin A and gonadotropin-releasing hormone in transcriptional activation of the rat follicle-stimulating hormone-beta gene. **Mol Endocrinol.** v.19, p. 237–254, 2005.

GRINNA, L.S.; TSCHOPP, J.F. Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Yeast** v. 5, p.107-115, 1989.

HAFEZ, ESE. **Reproduction in farm animals**, 6<sup>a</sup> ed, Lea e Febiger, p.461-502, 1993.

[HARRINGTON, A.E.](#); [MORRIS-TRIGGS, S.A.](#); [RUOTOLO, B.T.](#); [ROBINSON, C.V.](#); [OHNUMA, S.](#); [HYVÖNEN, M.](#) Structural basis for the inhibition of activin signalling by follistatin. [Embo J.](#) v.25, n.5, p.1035-1045, 2006.

HASEGAWA, Y.; K. MIYAMOTO; S. IWAMURA; IGARASHI, M. Changes in serum concentrations of inhibin cyclic pigs. [J. Endocrinol.](#) v. 118, p. 211-219, 1998.

[HELLWIG, S.](#); [EMDE, E.](#); [RAVEN, N.P.](#); [HENKE, M.](#); [VAN, D.E.R.](#); [LOGT, P.](#); [FISCHER, R.](#) Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using on-line methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations. [Biotechnol Bioeng.](#) v.74, n.4, p.344-52, 2001.

[HIRSHFIELD, A.N.](#) Comparison of granulosa cell proliferation in small follicles of hypophysectomized, prepubertal, and mature rats. [Biol Reprod.](#) v.32, n.4, p.979-87, 1985.

[HIRSHFIELD, A.N.](#) Development of follicles in the mammalian ovary. [Int Rev Cytol.](#) v.124, p.43-101, 1991.

[HIRSHFIELD, A.N.](#); [MIDGLEY, J.R.](#) Morphometric analysis of follicular development in the rat. [Biol Reprod.](#) v.19, n.3, p.597-605, 1978.

HÜBNER, G.; ALZHEIMER, C.; WERNER, S. Activin A: a novel player in tissue repair process. [Histol Histopathol.](#) v.14, p.295-304, 1999.

H TTEN, G.; NEIDHARDT, H.; SCHNEIDER, C.; POHL, J. Cloning of a new member of the TGF-beta family: a putative new activin beta-C chain. [Biochem Biophys Res Commun.](#) v. 206, p. 608-613, 1993.

JONES, R.L.; ALAMONSEN, L.A.; HAO, Y.C.; ETHIER, J.F.; DRUMOND, E.; FINDLAY, J.K. Expression of activin receptors, follistatin and betaglycan by human endometrial stromal cells consist with a role for activins during decidualization. [Mol Hum Reprod.](#) v. 8, p.363-374, 2002.

KALKOHOVEN, E.; ROELEN, B.A.; WINTER, J.P.; MUMMER, Y.C.L.; VAN DEN EIJNDEN-VAN R., A.J, VAN DER S. PT, VAN DER B., B. Resistance to transforming growth factor beta and activin due to reduced receptor expression in human breast tumor cell lines. [Cell Growth Differ.](#) v.6, p. 1151-1161, 1995.

KATAYAMA, T.; SHIOTA, K.; TAKAHASHI, M. Activin A increases the number of follicle-stimulating hormone cells in anterior pituitary cultures. **Mol Cell Endocrinol.** v. 69, p.179-185, 1990.

KISHI, H.; MINEGISHI, T.; TANO, M.; KAMEDA, T.; IBUKI, Y.; MIYAMOTO, K. The effect of activin and FSH on the differentiation of rat granulosa cells. **Febs Lett.** v. 422, p.1296-1299, 1998.

KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. **Anim Reprod Sci.** v. 78, 165-183, 2003.

KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction.** v.132, n.2, p.191-206, 2006.

KOST, T.A.; CONDREAY, J. P. Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. **Curr Opin Biotechnol.** v.10, p.428-433, 1999.

KUMAR, T.R.; AGNO, J.; JANOVICK, J.A.; CONN, P.M.; MATZUK, M.M. Regulation of FSHbeta and GnRH receptor gene expression in activin receptor II knockout male mice. **Mol Cell Endocrinol.** v. 212, p.19-27, 2003.

KUMAR, T.R.; WANG, Y.; LU, N.; MATZUK, M.M. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. **Nature Genetics.** v.15, p. 201-204, 1997.

LAMBA, P.; SANTOS, M.M.; PHILIPS, D.P.; BERNARD, D.J. Acute regulation of murine follicle-stimulating hormone beta subunit transcription by activin A. **J Mol Endocrinol.** In press, v. 36, p. 201-220, 2005.

LAU, AL.; KUMAR, TR.; NISHIMORI, K.; BONADIO, J & MATZUK, MM. Activin beta C and betaE genes are not essential for mouse liver growth, differentiation, and regeneration. **Mol Cell Biol.** v. 20, p. 6127-6137, 2000.

LAYMAN, L.C.; MCDONOUGH, P.G. Mutations of follicle stimulating hormone-beta and its receptor in human and mouse: genotype/phenotype. **Mol Cell Endocrinol.** v. 161, p. 9-17, 2000.

LI, R.; PHILLIPS, D.M.; MATHER, J.P. Activin promotes ovarian follicle development *in vitro*. **Endocrinology.** v. 136, p. 849- 856, 1995.

LI, R.; PHILLIPS, D.M.; MOORE, A.; MATHER, J.P. Follicle-stimulating hormone induces terminal differentiation in a predifferentiated rat granulosa cell line (ROG). **Endocrinology**. v. 138, p. 2648-2657, 1997.

LIN, S.J.; LERCH, T.F.; COOK, R.W.; JARDETZKY, T.S.; WOODRUFF, T.K. The structural basis of TGF-beta, bone morphogenetic protein, and activin ligand binding. **Reproduction**. v.132, n. 2, p.179-190, 2006.

LIN, S.Y.; MORRISON, J.R.; PHILLIPS, D.J.; DE, KRETZER. D.M. Regulation of ovarian function by the TGF-beta superfamily and follistatin. **Reproduction**. v.126, p.133- 158, 2003

LING, N.; YING, S.Y.; UENO, N.; SHIMASAKI, S.; ESCH, F.; HOTTA, M.; GUILLEMIN, R. A homodimer of the  $\alpha$ -subunits of inhibin A stimulates the secretion of pituitary follicle stimulating hormone. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 138, p. 1129-1137, 1986.

LING, N.; YING, S-Y.; UENO, N.; SHIMASAKI, S.; ESCH, F.; HOTTA, M.; GUILLEMIN, R. Pituitary FSh is released by a heterodimer of the  $\beta$ - subunits from the two forms of inhibin. **Nature**. v. 321, p. 779-782, 1986.

LUISI, S.; FLORIO, P.; REIS, F.M.; PETRAGLIA, F. .Expression and secretion of Activin - A: possible physiological and clinical implications. **Eur J Endocrinol**. v. 145, p. 225- 236, 2001.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M.L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L.M. Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system. **Yeast**. v. 22, n. 4, p.249-270, 2005.

MAESHIMA, K.; MAESHIMA, A.; HAYASHI, Y.; KISHI, S.; KOJIMA, I.; Crucial Role of Activin A in tubulogenesis of endothelial Cells Induced by vascular Endothelial Growth Factor. **Endocrinology**. v.145, n.8, p. 3739-3745, 2004.

MASSAGUÉ, J. TGF-  $\beta$  signal transduction. **Annu Rev Biochem**. v.67, p. 753-791, 1998

MASSAGUÉ, J.; WOTTON, D. Transcriptional control by the TGF Smad signaling system. **Embo J**. v.19, p.1745-1754, 2000.

MATHER, J.P.; MOORE, A.; LI, R. Activins, inhibins, and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators. **Proc Soc Exp Biol Med**. v. 215, p. 209-222, 1997.

MATHER, J.P.; WOODRUFF, T.K.; KRUMMEN, L.A. Paracrine regulation of reproductive function by inhibin and activin. **Proc Soc Exp Biol Med.** v. 201, p.1-15, 1992.

MATHEWS, L.S. Activin receptors and cellular signaling by the receptor serine kinase family. **Endocrinol Rev.** v.15, p. 310-325, 1994.

MCPHERRON, A.C.; LEE, S.J. GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor- superfamily containing a novel pattern of cysteines. **J Biol Chem.** v. 268, p. 3444-3449, 1993.

MELLOR, S.L.; CRANFIELD, M.; RIES, S.; PEDERSEN, J.; CANCELLA, B.; DE KRESTER. Localization of activin beta (A)-, beta (B)-, and beta (C)-subunits in human prostate and evidence for formation of new activin heterodimers of beta (C)-subunit. **J Clinical Endocrinol Metab.** v. 85, p. 4851- 4858, 2000.

MUNZ, B.; HUBNER, G.; TRITTER, Y.; ALZHEIMER, C.; WERNER, S. A novel role of activin in inflammation and repair. **J Endocrinology.** v. 161, p. 187-193, 1999.

MUTTUKRISNA, S.; TANNETTA, D.; GROOME, N.; SARGENT, I. Activin and follistatin in female reproduction. **Mol Cell Endocrinol.** v. 225, p. 45-56, 2004.

NAKAMURA, M.; MINEGISHI, T.; HASEGAWA, Y.; NAKAMURA, K.; IGARASHI, S.; ITO, I.; SHINOZAKI, H.; MIYAMOTO, K.; ETO, Y.; IBUKI, Y.; Effect of an activin A on follicle-stimulating hormone (FSH) receptor messenger ribonucleic acid levels and FSH receptors expressions in cultured rat granulose cells. **Endocrinology.** v. 133, p.538-544, 1993.

NAKAMURA, T.; ASASHIMA, M.; ETO, Y.; TAKIO, K.; UCHIYAMA, H.; MORIYA, N.; ARIIZUMI, T.; YASHIRO, T.; SUGINO, K.; TITANI, K.; SUGINO, H. Isolation and characterization of native activin B. **J Biol Chem.** v. 267, p.16385-16389, 1992.

NASCIMENTO, LIVIA. **Detecção de ativina A e folistatina no sangue menstrual: comparação entre mulheres sadias e portadoras de sangramento uterino disfuncional.** Dissertação de mestrado em medicina. UFMG, Belo Horizonte, 2006. Disponível em: [http://www.medicina.ufmg.br/cpg/gob/teses.dissert/2006\\_li\\_via\\_nascimento\\_mestrado.pdf](http://www.medicina.ufmg.br/cpg/gob/teses.dissert/2006_li_via_nascimento_mestrado.pdf). Acesso em 08.09.2007

ODA, S.; NISHIMATSU, S.; MURAKAMI, K.; UENO, N. Molecular cloning and functional analysis of a new activin beta subunit: a dorsal mesoderminducing activity in *Xenopus*. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 210, p. 581-588, 1995.

PANGAS, S.A.; WOODRUFF, T.K. Activin signal transduction pathways. **Trends Endocrinol Metab.** v.8, p.309-314, 2000.

PANGAS, S.A.; WOODRUFF, T.K. Production and purification of recombinant human inhibin and activin. **J Endocrinol.** v.172, n.1, p.199-210, 2002.

PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal.** FEPE-MVZ. Belo Horizonte, p. 366-373, 1996.

PIEPENBURG O, GRIMMER D, WILLIAMS PH, SMITH JC. Activin redux: specification of mesodermal pattern in *Xenopus* by graded concentrations of endogenous activin B. **Development.** v.131, n.20, p. 4977-86, 2004.

PHILLIPS, D.J. Activins, inhibins and follistatins in the large domestic species. *Domest Anim Endocrinol.* v. 28, p.1-16, 2005.

RABINOVICI, J.; S. J. SPENCER, S. J.; R. B. JAFFE. Recombinant human activin-A promotes proliferation of human luteinized preovulatory granulosa cells in vitro. **J Clin Endocrinol Metab.** v.71,1396-1398,1990.

RICHARDS, JS. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiol Rev.** v. 60, p. 51-89, 1980.

RICHARDS, J.S.; RUSSELL, D.L.; OCHSNER, S.; HSIEH, M.; DOYLE, K.H.; FALENDER, A.E.; LO, Y.K.; SHARMA, S.C. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. **Recent Progress Hormo Research.** v. 57, p. 195-220, 2002.

RIVIER, J.; SPIESS, J.; MCCLINTOCK, R.; VAUGHAN, J.; VALE, W. Purification and partial characterization of inhibin from porcine follicular fluid. **Biochem Biophys Res Commun.** v.133, p.120-127, 1985.

ROBERTS, V.; MEUNIER, H.; VAUGHAN, J.; RIVIER, J.; RIVIER, C.; VALE, W.; SAWCHENKO, P. Production and regulation of inhibin subunits in pituitary gonadotropes. **Endocrinology.** v. 124, p. 552-554, 1989.

ROBERTS, V.J.; PETO, C.A.; VALE, W.; SAWCHENKO, P.E. Inhibin/ activin subunits are costored with FSH and LH in secretory granules of the rat anterior pituitary gland. **Neuroendocrinology.** v. 56, p.214-224,1992.

SCHWALL, R.H. Activin and activin receptors. **Encyclopedia of Reproduction**, vol.1. San Diego: Academic Press, p. 26-35, 1999.

[SILVA, J.R.](#); [VAN, DEN HURK R.](#); [VAN, TOL HT.](#); [ROELEN, B.A.](#); [FIGUEIREDO, J.R.](#) Gene expression and protein localisation for activin-A, follistatin and activin receptors in goat ovaries. **J Endocrinol.** v.183, n.2, p. 405 - 415, 2004.

SMITH, J.C.; PRICE, B.M.; VAN, NIMMEN, K, HUYLEBROECK. D. Identification of a potent *Xenopus* mesoderm-inducing factor as a homologue of activin A. **Nature.** v. 345, p. 729 -731, 1990.

SOERS, J.R.; PEKARY, A.E.; HERSHMAN, J.M.; KANTER, M.; DSTEFANO, J.J. Metabolism of exogenous human chorionic gonadotropin in men. **J Endocrinol.** v. 80, p. 83-89, 1979.

SREEKRISHMA, K.; BRANKAMP, R.G.KROPP, K. E.; BLANKENSHIP, D.T.; TSAY, J-T; SMITH, P.L.; WIERSCHKE, J. D.; SUBRAMANIAM, A.; BIRKENBERGER, L.A. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologus protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene** v.190, p.55-62, 1997.

STOCK, A.E.; WOODRUFF, T.K.; SMITH, L.C. Effects of inhibin A and activin A during in vitro maturation of bovine oocytes in hormone- and serum-free medium. **Biol Reprod.** v. 56, p.1559–1564, 1997.

SUGINO, H.; T. NAKAMURA; Y. HASEGAWA; MIYAMOTO, K.; ABE, Y.; IGARASHI, M.; Y. ETO;; H. SHIBAI; K. TITANI. Erythroid differentiation factor can modulate follicular granulosa cell functions. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 153, p. 281-288, 1988.

[SUSZKO, M.I.](#); [BALKIN, D.M.](#); [CHEN, Y.](#); [WOODRUFF, T.K.](#) Smad3 mediates activin-induced transcription of follicle-stimulating hormone beta-subunit gene. **Mol Endocrinol.** v.19, n.7, 1849-1858, 2005.

[SUSZKO, M.I.](#); [L.O, D.J.](#); [SUH, H.](#); [CAMPER, S.A.](#); WOODRUFF, T.K. Regulation of the rat follicle-stimulating hormone beta-subunit promoter by activin. **Mol Endocrinol.** v. 17, n.3, p.318-332, 2003.

TADA, T.; ENDO, M.; HIRONO, I.; TAKASHIMA, F.; AOKI, T. Differential expression and cellular localization of activin and inhibin mRNA in the rainbow trout ovary and testis. **Gen Comp Endocrinol.** v.125, p.142-149, 2002.

THEMMEN, A.P.N.; HUHTANIEMI, I.T. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. **Endocrine Reviews**. v. 21. p. 551-583, 2000.

[THOMAS, F.H.](#); [ARMSTRONG, D.G.](#); [TELFER, E.E.](#) Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles in vitro. **Reprod Biol Endocrinol**. v. 3, n. 1, p.76, 2003.

TSCHOPP, J.F.; SVERLOW, G.; KOSSON, R.; CRAIG, W.; GRINNA, L. High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Bio Technology**. v. 5, p.1305-1308, 1987.

TSUCHIDA, K.; MATSUZAKI, T.; YAMAKAWA, N.; LIU, ZH.; SUGINO, H. Intracellular and extracellular control of activin function by novel regulatory molecules. **Mol Cell Endocrinol**. v. 180, p. 25-31, 2001.

[UILENBROEK JT](#), [RICHARDS JS](#). Ovarian follicular development during the rat estrous cycle: gonadotropin receptors and follicular responsiveness. **Biol Reprod**. v.20, n.5, p.1159-65, 1979

UNIVERSIDADE SÃO PAULO (U.S.P.). **Folículos ovarianos em diferentes fases de desenvolvimento** <<http://www.rge.fmrp.usp.br/cursos/zm/ovog.htm>>. Acesso em: 10.nov.2007.

VALE, W.; BILEZIKJIAN, LM.; RIVIER, C.; **The Physiology of Reproduction**, 2 ed, Raven Press, Ltd, New York, p. 1861-1878, 1994.

VALE, W.; RIVIER, J.; VAUGHAN, J.; MCCLINTOCK, R.; CORRIGAN, A.; WOO, W.; KARR, D.; SPIESS, J. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. **Nature** v.321, p. 776-779, 1986.

XIAO, S.; FINDLAY, J.K.; ROBERTSON, D.M. The effect of bovine activin and follicle-stimulating hormone (FSH) suppressing protein/ follistatin on FSH-induced differentiation of rat granulosa cells in vitro; **Mol Cell Endocrinol**. v. 69, p. 1-8, 1990.

XIAO, S.; ROBERTSON, D.M.; FINDLAY, J.K. Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. **Endocrinology**. v.131, p.1009-1016, 1992.



WANG, Y.; GE, W. Spatial expression patterns of activin and its signaling system in the zebrafish ovarian follicle: evidence for paracrine action of activin on the oocytes. **Biol Reprod.** v.69, p.1998-2006, 2003.

WANG, Y.; GE, W. Developmental profiles of activin betaA, betaB, and follistatin expression in the zebrafish ovary: evidence for their differential roles during sexual maturation and ovulatory cycle. **Biol Reprod.** v.71, p. 2056-2064, 2004.

WEISS, J.; GUENDNER, M.J.; HALVORSON, L.M.; JAMESON, J.L. Transcriptional activation of the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene by activin. **Endocrinology.** v.136, p. 1885-1891, 1995.

WOODRUFF, T.K. Regulation of cellular and system by function by activin. **Biochem Pharmacol.** v. 55, p. 953-963, 1998.

WOODRUFF, T.K.; KRUMMEN, L.A.; LYON, R.J.; STOCKS, D.L.; MATHER, J.P. Recombinant human inhibin A and recombinant human activin A regulate pituitary and ovarian function in the adult female rat. **Endocrinology.** v.132, p. 2332-2341, 1993.

WOODRUFF, T.K.; MATHER, J.P. Inhibin, activin and the female reproductive axis. **Annu Rev Physiol.** v. 57, p. 219-244, 1995.

WOODRUFF, T.K.; LYON, R. J.; HANSEN, S. E.; RICE, G. C.; MATHER, J. P. Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. **Endocrinology.** v. 127, p. 3196-3205, 1990.

WU, T.; PATEL, H.; MUKAI, S.; MELINO, C.; GARG, R.; NI, X.; CHANG, J.; PENG, C. Activin, inhibin, and follistatin in zebrafish ovary: expression and role in oocyte maturation. **Biol Reprod.** v. 62, p.1585-1592, 2000.

YAMADA, Y.; YAMAMOTO, H.; YONEHARA, T.; KANASAKI, H.; NAKANISHI, H.; MIYAMOTO, E.; MIYAZAKI, K. Differential activation of the luteinizing hormone beta-subunit promoter by activin and gonado-tropin-releasing hormone: a role for the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in LbetaT2 gonadotrophs. **Biol Reprod.** v. 70 236-243, 2004

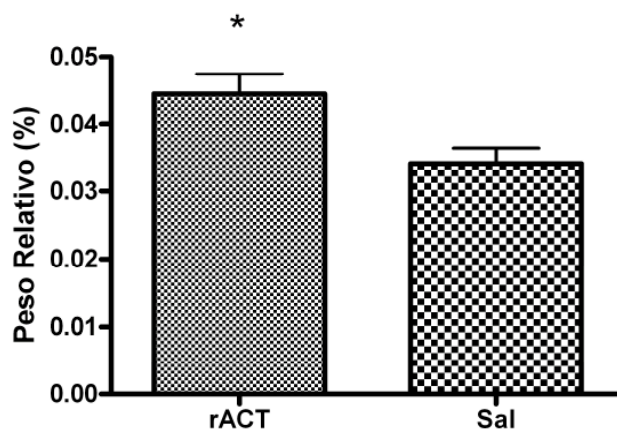
[YOKOTA, H.](#); [YAMADA, K.](#); [LIU, X.](#); [KOBAYASHI J.](#) [ABE Y.](#); [MIZUNUMA, H.](#); [IBUKI, Y.](#) Paradoxical action of activin A on folliculogenesis in immature and adult mice. **Endocrinology.** v. 138, n.11, p. 4572-4576, 1997.

[ZAPATERO-CABALLERO, H.](#); [SANCHEZ-FRANCO, F.](#); [FERNANDEZ-MENDEZ, C.](#);  
[GARCÍA-SAN, FRUTOS M.](#); [BOTELLA-CUBELLS, LM.](#); [FERNANDEZ-VAZQUEZ, G.](#)  
Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression during pubertal development of  
female rats. [Biol Reprod.](#) v.70, n.2; p.348-355, 2004.

**APÊNDICE A** - Resultados obtidos com outros tratamentos de rACT bruta e purificada.

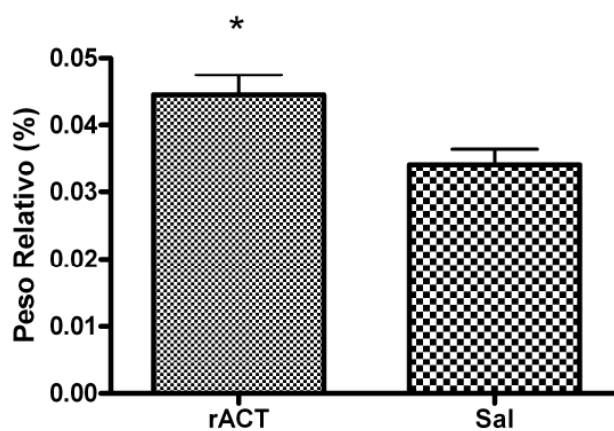
## APÊNDICE A - Resultados obtidos em tratamentos com outras doses de rACT bruta e purificada

A figura A1 apresenta os resultados obtidos com a dose de 35 µg de proteína bruta. Na análise estatística foi possível observar uma diferença significativa no peso dos ovários entre os grupos tratados ( $0,0444 \pm 0,003$ ) comparados ao grupo controle ( $0,0341 \pm 0,0023$ ).



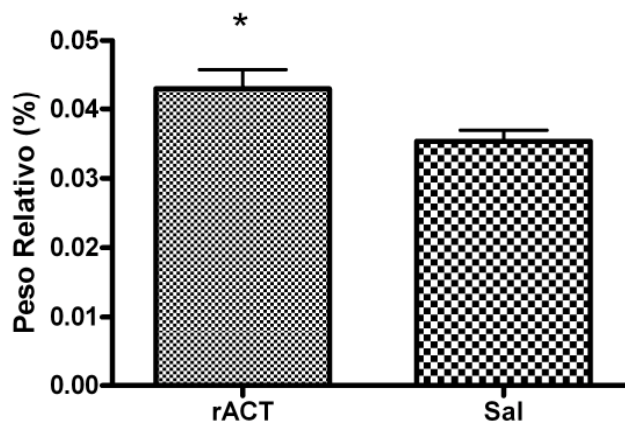
**Figura A1.** Efeito da injeção de 35 µg de rACT bruta (n = 8) e de salina (Sal, n = 7) sobre o peso dos ovários de ratas Wistar. \* P < 0,05 vs controle.

A figura A2 apresenta os resultados obtidos com a dose de 30 µg proteína bruta de rACT. Após o tratamento foi possível observar uma diferença significativa no peso dos ovários entre os grupos tratados ( $0,044 \pm 0,0026$ ) comparados ao grupo controle ( $0,0311 \pm 0,0029$ ).



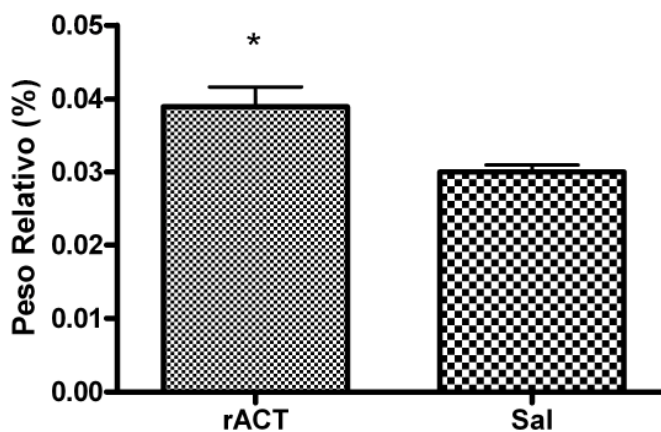
**Figura A2.** Efeito da injeção de 30 µg de rACT bruta (n = 4) e de salina (Sal, n = 4) sobre o peso dos ovários de ratas Wistar. \* P < 0,05 vs controle.

Os resultados obtidos com o tratamento de 25 µg de rACT bruta são apresentados na figura A3. Na análise foi possível observar uma diferença significativa no peso dos ovários entre os grupos tratados ( $0,0431 \pm 0,0027$ ) comparados ao grupo controle ( $0,0353 \pm 0,0015$ ).



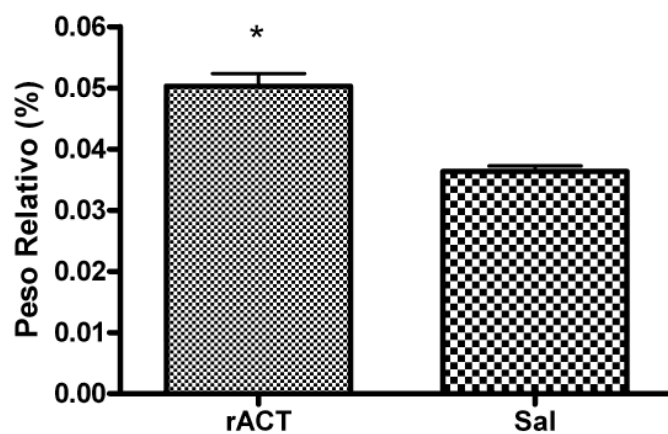
**Figura A3.** Efeito da injeção de 25 µg de rACT bruta (n = 7) e de salina (Sal, n = 7) sobre o peso dos ovários de ratas Wistar. \* P < 0,05 vs controle.

Os resultados do efeito da dose de 1 µg de rACT *purificada* sobre o peso dos ovários são observados na figura A4. Foi observada diferença significativa no aumento do peso dos ovários para o grupo tratado com activina purificada ( $0,0389 \pm 0,0025$ ) quando comparado ao grupo controle ( $0,0299 \pm 0,0009$ ).



**Figura A4.** Efeito da injeção de 1 µg de rACT purificada (n = 6) e de salina (Sal, n = 4) sobre o peso dos ovários de ratas Wistar \* P < 0,05 vs controle.

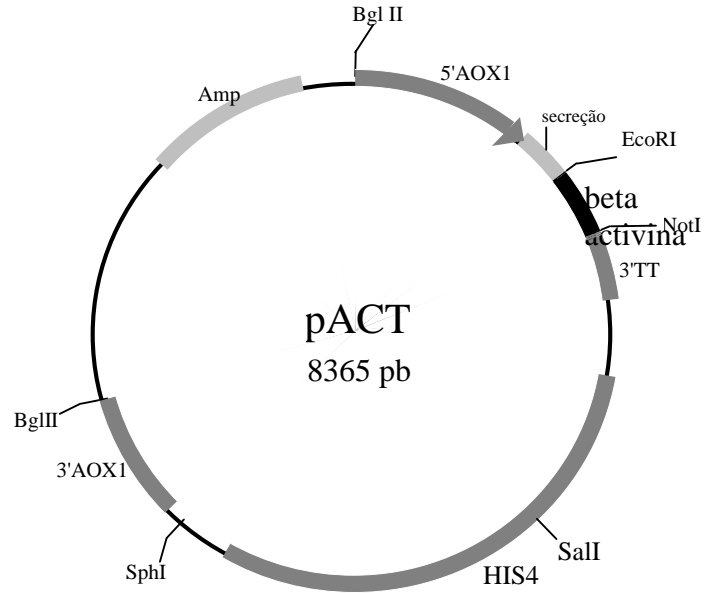
Os resultados obtidos no tratamento com a dose de 0,5  $\mu\text{g}$  de rACT *purificada* são apresentados na figura A5. Foi observada diferença significativa no peso dos ovários entre os grupos tratados ( $0,0503 \pm 0,002$ ) quando comparado ao grupo controle ( $0,03631 \pm 0,0008$ ).



**Figura A5:** Efeito da injeção de 0,5  $\mu\text{g}$  de rACT purificada (n = 5) e de salina (Sal, n = 4) sobre o peso dos ovários de ratas Wistar. \* P < 0,01 vs controle.

**ANEXO A** - Plasmídeo contendo o inserto cDNA da cadeia beta da activina

**ANEXO A** - Plasmidio contendo cDNA da cadeia beta da activina flanqueada pelo gene AOX (pACT).





**ANEXO B – Meios de culturas e soluções**

**MEIO DE CULTURA YPD**

- 1% de extracto de levedura
- 2% de peptona
- 2% de dextrose
- 3,2 g de Select Agar para 100 mL do meio

**MEIO DE CULTURA MGY**

- 1,34% YNB
- 1% glicerol
- $4 \times 10^{-5}$ % biotina
- Água Milli-Q para completar o volume.

**MEIOS E SOLUÇÕES PARA BIORREATOR****Meio glicerol e sais** (Preparo de 3 litros)

CaSO <sub>4</sub>	0,67 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	13,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	11,25 g
KOH	3,09 g
Glicerol	120 mL (40 mL/L)

Adicionar 20 mL ácido ortofosfórico e ajustar o pH a 5 com hidróxido de amônio.

**PTM1**

Sulfato cúprico 5H <sub>2</sub> O	6,0 g
Iodeto de sódio	0,08 g
Sulfato de manganês	3,0 g
Molibdato de sódio 2H <sub>2</sub> O	0,2 g
Ácido bórico	0,02 g
Cloreto de cobalto	0,5 g
Cloreto de zinco	20,0 g
Sulfato ferroso 7H <sub>2</sub> O	65,0 g

Biotina 0,2 g  
Ácido sulfúrico 5,0 mL  
Completar para um volume final de 1000 mL de H<sub>2</sub>O

### **Glicerol 50% + PTM 1**

500 mL de glicerol  
12 mL de PTM1  
Completar com água para um volume final de 1000 mL

### **Metanol + PTM1**

12 mL de PTM1 completar com metanol até um volume de 1000 mL.

### **Biotina 500 X**

20 mg de biotina qsp 100 mL de solução.

## **SOLUÇÕES PARA ESTIMAR PROTEÍNAS**

### **BSA (Soroalbumina bovino)**

0,1 mg/ mL

### **Coomassie blue G - 250 (Proteoquant)**

Preparação para um litro:

100 mg de coomassie blue G-250  
100 mL de ácido orto-fosfórico 85%  
50 mL de etanol 96%  
850 mL de água destilada

Pesar 100 mg de coomassie e colocar sob agitação por 30 min na solução de 100 mL de ácido orto-fosfórico 85%, mais 850 mL de água destilada, o que não dissolver acrescentar o etanol.

## **SOLUÇÕES PARA SDS-PAGE**

### **Tampão de amostra**

2,4 mL de tampão Tris HCl 1 M pH 6,8  
0,8 g de SDS;  
4 mL de glicerol 100%;

500  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol;

50  $\mu$ L de azul de bromofenol 0,1% (p/v)

Completar o volume final para 10 mL.

### **Solução de acrilamida-bisacrilamida 30%**

Acrilamida - 29,20 g

Bis-acrilamida - 0,8 g

Completar para 100 mL de solução.

Filtrar e colocar em um frasco escuro a 4 °C

### **Tampão do gel de separação**

Tris HCl 2 M (pH 8,8)/ SDS

24,22 g de Tris

0,4 g de SDS

Completar o volume final para 100 mL

### **Tampão do gel de empacotamento**

Tris HCl 1 M (pH 6,8)/SDS

12,1 g de Tris

0,4 g de SDS

Completar o volume final para 100 mL

### **Persulfato de amônio (PSA) 10%**

0,5 g de persulfato de amônio em 5 mL de água deionizada.

### **Tampão de corrida 10X**

30 g Tris;

144 g glicina;

10 g SDS;

Completar para volume final de 1 L.

**Gel de poliacrilamida 12,5%**

2,7 mL de água deionizada

2,0 mL de tampão de separação

3,3 mL da solução de acrilamida/ bisacrilamida

100 µL de PSA

8,5 µL TEMED

Dearear antes de adicionar o TEMED

**Gel de empacotamento 5%**

2,0 mL de água Milliq

833 µL de tampão de empacotamento

417 µL de solução de acrilamida/ bisacrilamida

50 µL de PSA

10 µL de TEMED

**SOLUÇÕES PARA WESTERN BLOT****Salina fosfato tamponada (PBS) 10X**

Solução A:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,5 M;

Solução B:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,5 M;

Em um bequer contendo 90 g de NaCl e a solução B, adicionar a solução A até que o pH atinja 7,4. Filtrar.

Na solução de PBST adicionar Tween 20%.

**SOLUÇÕES PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA: TAMPÕES E SOLVENTES****Tampão de eluição para cromatografia de filtração**

Sephacryl S-200 (Acetato de amônio 50 mM com cloreto de sódio 0,3 M e azida sódica 0,02 %)

3,85 g de acetato de amônio

17,53 g de NaCl

0,2 g de azida sódica

Adicionar 900 mL de água, ajustar o pH para 7,5 com adição HCl. Ajustar o volume para 1 L.

**ANEXO C - Protocolos**

## **ANEXO C - PROTOCOLO DE COLORAÇÃO TÉCNICA H/E (EMPRESA HISTOTECH LTDA)**

### **Processamento, inclusão e obtenção dos cortes:**

Após a fixação dos fragmentos feita em formol 10%, os materiais foram desidratados em banhos sucessivos de etanol em concentrações crescentes (70-100%) e diafanizados em xilol. Três banhos de 2 horas em parafina precederam a inclusão em bloco no mesmo material. Segue abaixo a tabela das concentrações crescente de álcool, e a parafinização:

#### **Solução / tempo**

Álcool 70% - 1 hora

Álcool 95% - 1 hora

Álcool absoluto -6 horas

Xilol- 3 horas

Parafina - 6 horas

As peças foram incluídas em parafina. Foram obtidos cortes na posição longitudinal com 5 um de espessura, em micrótomo manual ( Leica – RM 2145). Os cortes uma vez coletados em lâminas, fora desparafinizados, tendo as lâminas passadas pela seqüência de imersões descrita no quadro abaixo, foram corados pelo Hematoxilina de Harris e Eosina de Lison .

#### **Solução / Tempo**

Xilol I - 10 min

Xilol II- 10 min

Álcool abs - 5 min

Álcool 95 % - 5 min

Álcool 70 % - 5 min

Lavar em água corrente - 3 min

Hematoxilina - 5 min

Diferenciador - rápido

Eosina - 1 min

Lavar rápido

Álcool 70% - 30 seg



Álcool 95% - 30 seg

Álcool abs - 3 min

Álcool abs - 5 min

Álcool/xilol (1:1) - 5 min

Xilol - 5 min

Xilol - 5 min

Montagem em bálsamo da Fischer.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)