

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA – BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

**Avaliação imunológica de proteínas recombinantes produzidas em linhagens de
Escherichia coli produtora e não produtora de lipopolissacarídeos endotóxicos**

Carolina Lumertz Martello

Trabalho de Conclusão de Curso

Prof. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Orientador

Porto Alegre, dezembro de 2014

Carolina Lumertz Martello

Avaliação imunológica de proteínas recombinantes produzidas em linhagens de *Escherichia coli* produtora e não produtora de lipopolissacarídeos endotóxicos

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia com Habilitação em Biotecnologia Molecular.

Prof. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Orientador

Porto Alegre, dezembro de 2014

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e principalmente por todos os ensinamentos e paciência ao longo de sua orientação.

À Msc Fernanda Leal, por sempre estar ao meu lado, me ajudar e apoiar no decorrer de todo esse trabalho e através de todos os percalços que enfrentamos, que felizmente levaram ao desenvolvimento de uma amizade.

Às colegas do laboratório 210, Jéssica, Veridiana e Karina, por sempre me ajudarem quando precisei, me auxiliando e ensinando dia a dia.

A todos os colegas dos laboratórios 204 e 206, ao Prof. Arnaldo Zaha e à Profa. Karina Monteiro, que junto fazem parte dessa grande equipe em que fico feliz de ter me inserido e participar.

À minha mãe, Maria, que sempre me apoiou nas minhas escolhas e me ajudou nos meus momentos de incertezas, sendo sempre maravilhosa e receptiva a todos meus problemas e necessidades.

Ao meu pai, que mesmo não entendo ao certo o que eu faço, sempre entendeu os momentos em que precisei estudar e não podia vê-lo, sempre me apoiou, confiando no meu julgamento, e ajudou em tudo que precisei.

À minha irmã, Fernanda, por também sempre estar presente e me aconselhar quando pedi e, principalmente, por ser meu modelo, tanto profissional quanto pessoal, que sigo desde pequena.

Aos meus amigos e colegas, Gabriela, Fábio e Patrícia, imensamente pela amizade e companheirismo que sempre demonstraram, mas também por toda ajuda direta que recebi para concretização desse trabalho, através de incentivo, discussões e auxílio.

RESUMO

Organismos-modelo são amplamente utilizados na pesquisa como um recurso fácil e uniforme de fazer estudos. A bactéria *Escherichia coli* é o modelo procariótico universal, amplamente utilizado para a expressão de proteínas recombinantes. Entre os estudos que utilizam proteínas recombinantes se destacam estudos imunológicos, como avaliação da resposta imune desencadeada em animais. *Mus musculus* se apresenta como um modelo imunológico extensamente utilizado para mamíferos. Contudo, proteínas recombinantes expressas em *E. coli* apresentam contaminação por lipopolissacarídeos (LPS), moléculas presentes na membrana externa de bactérias gram-negativas, que atuam como potente endotoxinas e desencadeiam resposta imune celular em contato com o sistema imune de mamíferos. Metodologias de remoção de LPS podem ser alternativas para esse problema. A linhagem de *E. coli* ClearColi BL21 (DE3) (ClearColi) também se apresenta como alternativa por sintetizar um precursor do LPS, o lipídeo IV_A, que possui um caráter endotóxico mais fraco em comparação ao LPS. O antígeno B de *Echinococcus granulosus* (EgAgB) é um oligômero composto de diversas subunidades e reconhecidamente antigênico, contudo, por possuir um centro lipofílico, apresenta dificuldade na avaliação da resposta imune celular que produz. O objetivo desse trabalho é avaliar a resposta imune celular desencadeada em esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados com a subunidade recombinante rEgAgB8/2 de EgAgB produzida em uma linhagem de *E. coli* tradicionalmente utilizada e produtora de LPS, a BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (RIL), e em ClearColi, produtora do lipídeo IV_A, com e sem o tratamento para remoção de LPS. Os esplenócitos estimulados foram avaliados quanto à produção das citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-4, sendo utilizados como controles positivos a proteína altamente imunogênica Concanavalina A e LPS purificado e, como controle negativo, a falta de estímulo. As análises apontaram diferença significativa com $p \leq 0,05$ da produção de IFN- γ e IL-10 na presença do controle positivo Concanavalina A em comparação aos outros estímulos, e ausência da produção de IL-4. Portanto, não há diferença entre a resposta imune celular desencadeada pela subunidade rEgAgB8/2 produzida pela *E. coli* RIL ou ClearColi, assim como não houve diferença entre as subunidades que sofreram e que não sofreram tratamento para remoção de LPS. Esses resultados são explicados pelo fato do oligômero formado pela subunidade rEgAgB8/2 possuir um centro lipofílico, evitando a remoção eficaz de LPS ou do lipídeo IV_A pelo tratamento utilizado. Novas análises utilizando uma proteína recombinante que não possua caráter lipofílico são necessárias para avaliar a eficácia do tratamento de remoção de LPS.

ABSTRACT

Model organisms are widely used as an easy and solid tool in research. *Escherichia coli* is the universal prokaryotic model, being widely used for recombinant protein expression. Immunological analyses stand out among studies employing recombinant proteins, such as, the evaluation induced immune response in animals. *Mus musculus* is a widely used mammal immune model. However, recombinant proteins expressed in *E. coli* showed lipopolysaccharide (LPS) contamination. LPS are molecules present in the outer membrane of gram-negative bacteria that act as endotoxins leading to cellular immune response in mammals. LPS removal methodologies can be alternatives to this problem. The *E. coli* strain ClearColi BL21 (DE3) (ClearColi) also presents itself as an alternative because it synthesizes a precursor of LPS – the lipid IV_A – which is a weaker endotoxin than LPS. *Echinococcus granulosus* antigen B (*EgAgB*) is an oligomer composed of several subunits that is very antigenic. However, by having a lipophilic center it is difficult to assess the cellular immune response it produces. The aim of this study is to evaluate the induced cellular immune response in splenocytes from BALB/c mice stimulated with recombinant subunit *rEgAgB8/2* from *EgAgB* produced in the traditional LPS producer *E. coli* strain BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (RIL) and in the lipid IV_A producer ClearColi, with and without LPS removal treatment. The stimulated splenocytes were assessed for production of IFN- γ , IL-10 and IL-4. The highly immunogenic protein Concavalin A and purified LPS were used as positive controls and the lack of stimulation was used as negative control. The analyses showed significant difference ($p \leq 0.05$) in IFN- γ and IL-10 production in the presence of Concavaline A in comparison to other stimuli. No production of IL-4 was observed for any stimuli. Therefore, there is no difference between the induced cellular immune response by subunit *rEgAgB8/2* produced by RIL or ClearColi *E. coli*, as there was no difference between the subunits that have or have not suffered the LPS removal treatment. These results are explained by the fact that the subunit *rEgAgB8/2* oligomer possesses a lipophilic center that prevents the effective LPS or lipid IV_A removal. Further analysis using a recombinant protein that doesn't have lipophilic character is needed to assess the efficacy of LPS removal treatment.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | v |
| ABSTRACT | vi |
| LISTA DE FIGURAS | ix |
| LISTA DE TABELAS | x |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xi |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 1.1 Organismos-modelo..... | 12 |
| 1.1.1 <i>Escherichia coli</i> | 12 |
| 1.1.1.1 Linhagens de <i>E. coli</i> para expressão de proteínas | 13 |
| 1.1.2 <i>Mus musculus</i> | 14 |
| 1.2 Expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i> para estudo imunológico | 15 |
| 1.3 Lipopolissacarídeos | 15 |
| 1.4 Antígeno B de <i>Echinococcus granulosus</i> | 17 |
| 1.5 Justificativas | 17 |
| 1.6 Objetivos..... | 18 |
| 1.6.1 Objetivo geral | 18 |
| 1.6.2 Objetivos específicos..... | 18 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 19 |
| 2.1 Preparação das soluções sem contaminação por endotoxinas | 19 |
| 2.2 Inserção da sequência codificadora da subunidade <i>EgAgB8/2</i> em <i>E. coli</i> RIL e ClearColi..... | 19 |
| 2.3 Expressão e purificação da subunidade recombinante <i>rEgAgB8/2</i> em <i>E. coli</i> RIL e ClearColi..... | 19 |
| 2.4 Avaliação da resposta imune celular em esplenócitos de camundongos BALB/c pela presença das citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-4 | 20 |
| 2.5 Teste estatístico..... | 20 |
| 3. RESULTADOS..... | 21 |

| | |
|--|----|
| 3.1 Expressão e purificação da subunidade rEgAgB8/2 de <i>E. granulosus</i> em <i>E. coli</i> RIL e ClearColi..... | 21 |
| 3.2 Avaliação da resposta imune celular pela presença de IFN- γ , IL-10 e IL-4 secretado por esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados com diferentes condições da subunidade rEgAgB8/2..... | 25 |
| 3.3 Comparação estatística das médias de produção de citocinas IFN- γ e IL-10 produzidos por esplenócitos de camundongos BALB/c em diferentes condições de estímulos da subunidade rEgAgB8/2..... | 26 |
| 4. DISCUSSÃO | 29 |
| 5. CONCLUSÕES | 31 |
| 6. PERSPECTIVAS | 32 |
| 7. BIBLIOGRAFIA | 33 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: LPS normal de <i>E. coli</i> K-12 comparado ao lipídeo IV _A de <i>E. coli</i> ClearColi. Adaptado de Lucigen Corporation (< http://lucigen.com/docs/manuals/MA145-ClearColi-BL21-DE3-Electocompetent-Cells.pdf > acesso em 17/11/2014 20:45) | 14 |
| Figura 2. Composição do LPS de <i>E. coli</i> . Adaptado de Scior et al. (2013)..... | 16 |
| Figura 3. Lipídeo IV _A . Adaptado de Scior et al. (2013)..... | 16 |
| Figura 4. SDS-PAGE 12% corado com Comassie blue mostrando a expressão da subunidade rEgAgB8/2 em <i>E. coli</i> RIL. | 21 |
| Figura 5. SDS-PAGE 12% corado com Comassie blue mostrando a expressão da subunidade rEgAgB8/2 em <i>E. coli</i> ClearColi..... | 22 |
| Figura 6. SDS-PAGE 12% corado com Comassie blue mostrando a subunidade recombinante rEgAgB8/2 produzida em <i>E. coli</i> RIL..... | 23 |
| Figura 7. SDS-PAGE 12% corado com Comassie blue mostrando a subunidade recombinante rEgAgB8/2 em <i>E. coli</i> ClearColi..... | 24 |
| Figura 8. SDS-PAGE 12 % corado com Comassie blue mostrando a subunidade rEgAgB8/2 após tratamento para remoção de LPS | 25 |
| Figura 9. Gráfico da comparação das concentrações de INF- γ secretado pelos esplenócitos estimulados com diferentes condições da subunidade rEgAgB8/2. | 27 |
| Figura 10. Gráfico da comparação das concentrações de IL-10 secretadas pelos esplenócitos estimulados com diferentes condições da subunidade rEgAgB8/2 | 28 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Concentração de IFN- γ secretados por esplenócitos em diferentes estímulos | 26 |
| Tabela 2. Concentração de IL-10 secretados por esplenócitos em diferentes estímulos | 26 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ClearColi: *E. coli* ClearColi BL21(DE3)

ClearColi_B2: ClearColi transformada com o pGEX-4T-2_B2

EgAgB8/2: subunidade 2 do antígeno B de *E. granulosus*

GST: glutationa-S-transferase

IFN- γ : interferon γ

IL-4: interleucina 4

IL-6: interleucina 6

IL-10: interleucina 10

IPTG: isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranoideo

LPS: lipopolissacarídeo

pGEX-4T-2_B2: plasmídeo pGEX-4T-2 contendo a sequência codificadora da subunidade *EgAgB8/2*

rB2_ClearColi: subunidade recombinante *rEgAgB8/2* produzida em ClearColi

rB2_RIL: subunidade recombinante *rEgAgB8/2* produzida em RIL

rB2^{-LPS}_ClearColi: *rEgAgB8/2* produzida em ClearColi com tratamento para remoção de LPS

rB2^{-LPS}_RIL: *rEgAgB8/2* produzida em RIL com tratamento para remoção de LPS

rEgAgB8/2: subunidade recombinante *EgAgB8/2*

rGST_B2_ClearColi: proteína de fusão GST e *rEgAgB8/2* produzida em ClearColi

rGST_B2_RIL: proteína de fusão GST e *rEgAgB8/2* produzida em RIL

RIL: *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL

RIL_B2: RIL transformada com o pGEX-4T-2_B2

TNF α : fator de necrose tumoral α

1. INTRODUÇÃO

1.1 Organismos-modelo

Organismos-modelo são amplamente utilizados na pesquisa como um recurso fácil e uniforme de fazer estudos (LING; XU, 2013). Eles são escolhidos baseados na sua simplicidade perante a representatividade de um grupo e auxiliam na pesquisa de características de outras espécies que apresentam maior complexidade e/ou são difíceis de manipular em laboratório, dos quais os resultados são extrapolados, dentro de certos limites, para outras espécies relacionadas. São exemplos de organismos-modelo a bactéria *Escherichia coli*, para bactérias, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, para eucariotos, *Arabidopsis thaliana*, para vegetais superiores, e *Mus musculus*, para mamíferos.

1.1.1 *Escherichia coli*

A bactéria *E. coli* é um organismo-modelo procariótico universal para a área de biologia molecular, ajudando no entendimento de diversos processos genéticos, bioquímicos e metabólicos (FORTERRE, 2013). Este é um organismo razoavelmente simples de ser manipulado e cultivado, possuiu ciclo de vida curto e diversas ferramentas de manipulação genética já desenvolvidas (CHOU, 2007). *E. coli* é amplamente utilizada, sendo alguns exemplos de usos mais recentes o desenvolvimento de combustíveis ecológicos (AKITA *et al.*, 2014), a funcionalidade de RNAs não traduzidos (KURYLLO *et al.*, 2014) e avanços no desenvolvimento da biologia sintética (MESSERSCHMIDT *et al.*, 2014), tudo devido à facilidade de engenharia genética desse organismo.

Um uso clássico para *E. coli* e também de grande importância, por sua versatilidade, é a expressão de proteínas heterólogas (BOJKO *et al.*, 2013; KUMARI *et al.*, 2014; LATA *et al.*, 2014). A expressão de proteínas em *E. coli* é vantajosa por ser um sistema bem desenvolvido e econômico quando comparado a outros organismos (HUANG *et al.*, 2012). Apresenta-se como o principal sistema utilizado para clonagem, modificação genética e produção em baixas escalas para fins de pesquisa, agregando diversas informações e uma variedade de ferramentas moleculares (FERRER-MIRALLES *et al.*, 2009). Essas características e a simplicidade do organismo resultam em um sistema completo e de manipulação fácil, existindo diversas linhagens específicas de expressão de proteínas (HUANG *et al.*, 2012).

1.1.1.1 Linhagens de *E. coli* para expressão de proteínas

As linhagens de *E. coli* inicialmente utilizadas para expressão de proteínas foram a BL21 e a K-12, a partir dessas, diversas outras linhagens foram criadas, resultando no amplo leque de opções que se possui atualmente (ROSANO; CECCARELLI, 2014). A linhagem BL21 foi vastamente utilizada para expressão de proteínas por perder os genes das proteases Lon e OmpT, evitando a degradação de proteínas exógenas e extracelulares (DAEGELEN *et al.*, 2009). A partir desta, foram desenvolvidas diversas outras linhagens descendentes, se destacando a BL21 (DE3), que além de perder as proteases, possui inserido em seu genoma o gene da RNA polimerase T7 (ROSANO; CECCARELLI, 2014), possuindo alto nível de expressão gênica quando o gene de interesse se encontra sob controle de um promotor T7.

A partir das linhagens BL21 e BL21(DE3), diversas outras descendentes foram desenvolvidas (EMBL Protein Expression and Purification Core Facility Protein Expression http://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_expression/ecoli/index.html acesso em 06/10/14 19:30), cada uma com sua modificação específica para suprir as necessidades do mercado. A linhagem BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (RIL), por exemplo, se apresentou inovadora por traduzir os códons raros AGG e AGA para arginina, AUA para isoleucina e CUA para leucina, facilitando a síntese de proteínas exógenas eucarióticas. Essa característica faz da RIL uma linhagem já conhecida e amplamente utilizada para expressão de genes eucarióticos possuidores de códons raros. Por outro lado, algumas tecnologias ainda estão sendo lançadas para suprir necessidades vigentes na pesquisa. A linhagem ClearColi BL21(DE3) (ClearColi) é um exemplo disso, pois sintetiza o lipídeo IV_A ao invés de um lipopolissacarídeo (LPS) normal, para assim evitar a contaminação da proteína produzida por esta endotoxina. O lipídeo IV_A é um dos precursores da porção lipídica presente no LPS, sua diferença se dá na perda da porção polissacarídea e de duas de suas seis cadeias acila (Figura 1).

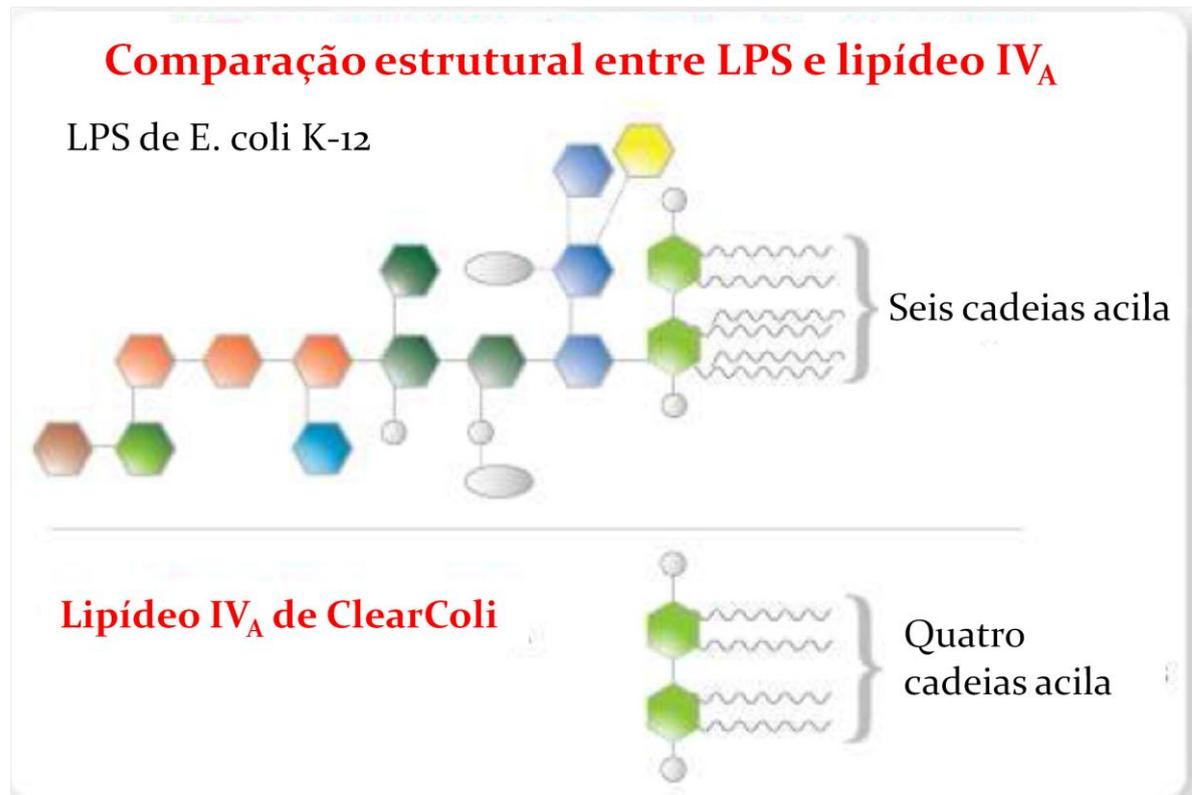


Figura 1: LPS normal de *E. coli* K-12 comparado ao lipídeo IV_A de *E. coli* ClearColi. Na linhagem de *E. coli* ClearColi o LPS perde a porção polissacarídica e duas das seis cadeias acila, sintetizando um lipídeo com quatro cadeias acila, conhecido como lipídeo IV_A (Adaptado de Lucigen Corporation, <<http://lucigen.com/docs/manuals/MA145-ClearColi-BL21-DE3-Electrocompetent-Cells.pdf>> acesso em 17/11/2014 20:45)

1.1.2 *Mus musculus*

O camundongo – espécie *Mus musculus* – é o organismo-modelo mais conhecido para mamíferos. Esse organismo apresenta fácil manutenção, procriação contínua e ciclo de vida curto. Além disso, a endogamia é bem tolerada por essa espécie, facilitando a criação de diversas linhagens de clones específicos que se fazem úteis para a pesquisa (LING; XU, 2013). Por estas linhagens serem geneticamente idênticas, é possível coletar e combinar dados no decorrer do tempo levando a uma caracterização fenotípica completa, situação rara entre outros sistemas de mamíferos (LORÍA-CERVERA, ANDRADE-NARVÁEZ, 2014). Por isso, este organismo se apresenta como um modelo para diversos tipos de estudos, destacando-se como modelo imunológico de mamíferos, tanto para elucidação de doenças (KIM *et al.*, 2014; SANCINI *et al.*, 2014), como teste de medicamentos (KIM *et al.*, 2014; LIOU *et al.*, 2014; MAROUFI *et al.*, 2014) e desenvolvimento de vacinas (VIRGINIO *et al.*, 2014; SANCHO *et al.*, 2014).

1.2 Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* para estudo imunológico

A expressão de proteínas recombinantes é uma estratégia extensamente utilizada na área de biologia molecular (BOJKO *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2014; KUMARI *et al.*, 2014; LATA *et al.*, 2014). A partir da expressão heteróloga e purificação de proteínas recombinantes, é possível estudá-las estrutural e funcionalmente. *E. coli*, por ser um modelo bem caracterizado e possuir diversas ferramentas molecular, é amplamente utilizada para produção de proteínas recombinantes, que são utilizadas para diversos fins, como adjuvantes para vacinas (DAVTYAN *et al.*, 2014), caracterização enzimática (QIU; LAI, 2013), uso industrial (ZAFAR *et al.*, 2014) e identificação de proteínas antigênicas (WAWEGAMA *et al.*, 2014). Para estudos imunológicos, por exemplo, proteínas recombinantes expressas em *E. coli* são utilizadas para imunização de animais e caracterização da resposta imune desencadeada (BAGHERI *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2014; KUMARI *et al.*, 2014). Contudo, a expressão heteróloga de proteínas em *E. coli* apresenta alguns obstáculos, como a perda das modificações pós-traducionais, a diferença de códons raros, a inviabilidade da célula pela toxicidade e a contaminação das proteínas purificadas por LPS (CHOU, 2007; FERRER-MIRALLES *et al.*, 2009).

1.3 Lipopolissacarídeos

LPS são moléculas presentes na membrana externa de quase todas as bactérias gram-negativas, que consistem em uma porção lipídica e um polissacarídeo (RAETZ; WHITFIELD, 2002; SCIOR *et al.*, 2013) (Figura 2). Sua função abrange a manutenção da integridade estrutural da membrana externa, a estabilidade da célula e a sua defesa – atuando como uma potente endotoxina. A porção lipídica do LPS, o Lipídeo A, é responsável pela ação de endotoxina, sendo reconhecida pelo receptor Toll-like 4 e o co-receptor MD-2, que ativa o fator de transcrição Nf-kB e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α e o IL-6 (KAWAI, AKIRA, 2010; LIEBERS *et al.*, 2008). O LPS, portanto, em contato com o sistema imune de outros animais, provoca reação imunológica, o que altera a confiabilidade da resposta imune gerada pela proteína e a confiabilidade nos resultados derivados desse sistema.

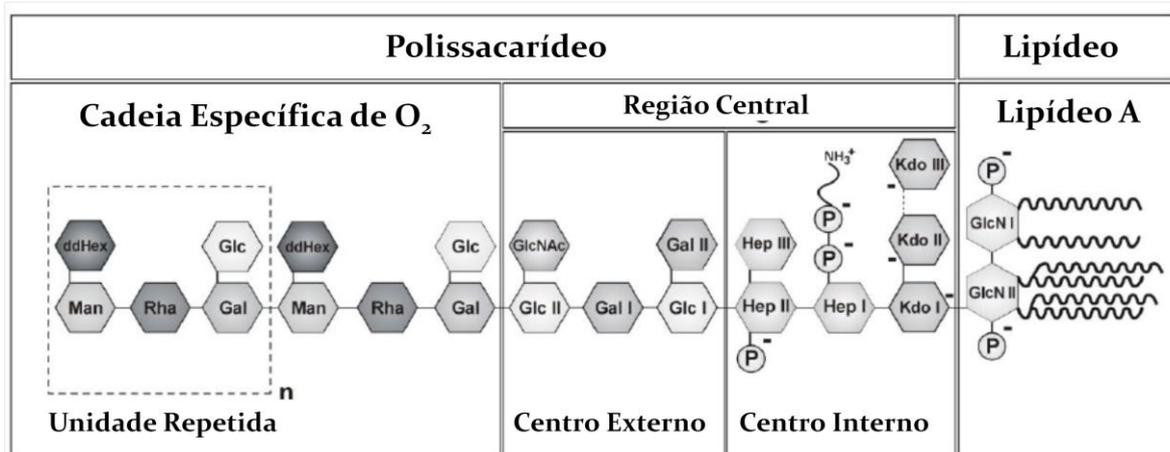


Figura 2: Composição do LPS de *E. coli*. Composição do LPS, contendo uma porção polissacarídica, dividida entre cadeia específica de oxigênio e região central, e uma porção lipídica, contendo o lipídeo A (Adaptado de Scior et al., 2013).

Em *E. coli*, o lipídeo A é sintetizado a partir de seu precursor lipídeo IV_A, que possui apenas quatro cadeias acila das seis encontradas no LPS (SCIOR *et al.*, 2013) (Figura 3). Esse precursor não desencadeia resposta imune em células humanas, pois o co-receptor imunológico MD-2 de humanos não o reconhece (MUROI *et al.*, 2006). Em camundongos e equinos, entretanto, o lipídeo IV_A é reconhecido pelo co-receptor destes mamíferos, e desencadeia resposta imunológica (MUROI *et al.*, 2006). Contudo, por apresentar quatro das seis cadeias acila presentes no lipídeo A, o reconhecimento do lipídeo IV_A no centro hidrofóbico formado pelo MD-2 permite a sobreposição de espaço, o que torna essa interação menos favorável energeticamente, fazendo com que este lipídeo possua um caráter endotóxico mais fraco em comparação ao lipídeo A (PARK, LEE, 2013).

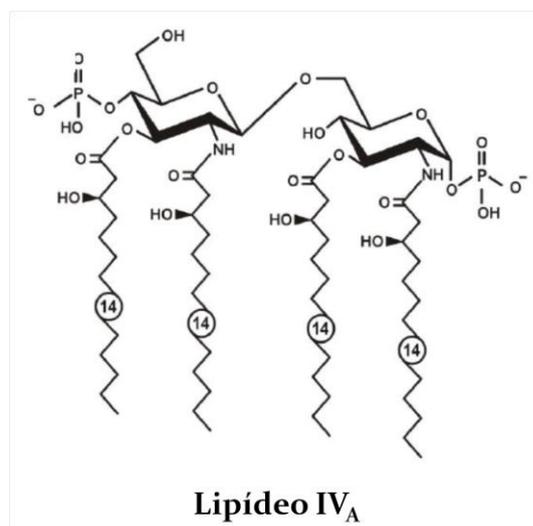


Figura 3: Lipídeo IV_A. Lipídeo IV_A é um precursor na cadeia de síntese do lipídeo A – porção lipídica do LPS.

(Adaptado de Scior et al., 2013)

1.4 Antígeno B de *Echinococcus granulosus*

Echinococcus granulosus é o agente causador da hidatidose cística, uma doença de prevalência mundial que afeta humanos, animais domésticos e de pecuária (ECKERT; DEPLAZES, 2004). O antígeno B (*EgAgB*) é o componente antigênico mais proeminente da fase larval patogênica de *E. granulosus* (MONTEIRO *et al.*, 2008). Supõe-se que essa proteína tenha função na interação parasita-hospedeiro, possuindo efeito inibidor de proteases do hospedeiro, capacidade imunorreguladora e propriedades ligantes de lipídeos (MONTEIRO *et al.*, 2008). Essa proteína se apresenta como um oligômero, possuindo cinco diferentes subunidades, de *EgAgB8/1* a *EgAgB8/5* (MONTEIRO *et al.*, 2012). Por essas subunidades possuírem um caráter anfifílico, esse oligômero possui um centro hidrofóbico enquanto as regiões polares ficam expostas ao solvente (MONTEIRO *et al.*, 2007).

A subunidade *EgAgB8/2* se apresenta como a mais antigênica em comparação às outras subunidades (VIRGINIO *et al.*, 2003). Estruturalmente, essa subunidade apresenta uma região central de baixa polaridade em apenas uma fase de sua α -hélice, possuindo caráter anfifílico característico da proteína *EgAgB* (MONTEIRO *et al.*, 2007). Ligações não-covalentes entre suas superfícies polar e apolar, portanto, permitem a formação de oligômeros mesmo como subunidade isolada (MONTEIRO *et al.*, 2008). Dessa forma, a subunidade *EgAgB8/2* apresenta afinidade por compostos hidrofóbicos, como LPS, fator que impediu a avaliação da resposta imune celular dessa subunidade (MONTEIRO *et al.*, 2008).

1.5 Justificativas

A utilização de organismos modelos de fácil manipulação e ampla aplicabilidade auxilia o desenvolvimento da pesquisa. Baseado nessa premissa, a melhora de organismos modelos existentes é importante. O modelo bacteriano *E. coli* é utilizado por laboratórios mundialmente, porém, mesmo que extremamente completo, não é perfeito. A produção de proteínas recombinantes por meio desse modelo apresenta contaminação por LPS, uma endotoxina que desencadeia alterações em estudos de resposta imune celular. A ClearColi

parece promissora para corrigir o obstáculo representado pela contaminação de proteínas recombinantes por LPS, fator que facilitaria diversos estudos imunológicos. O *EgAgB*, por sua vez, por possui afinidade por compostos hidrofóbicos, tem sua avaliação imunológica prejudicada pela contaminação por LPS, fazendo-se necessário sua expressão em um sistema que não possua contaminação por endotoxinas. Dentre suas subunidades, a *EgAgB8/2* se apresenta como altamente antigênica, facilitando a avaliação da resposta imune desencadeada. Dessa forma, a comparação das respostas imune celular desencadeadas em esplenócitos de camundongos BALB/c pelo estímulo com a subunidade recombinante *EgAgB8/2* (*rEgAgB8/2*) produzida na linhagem normalmente utilizada RIL e na nova tecnologia ClearColi com e sem tratamento para remoção da contaminação de LPS, permitirá a elucidação da real aplicabilidade desta nova linhagem de bactéria e da viabilidade desse tratamento em associação com o modelo imunológico murino.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo geral

Comparação da resposta imune celular de camundongos BALB/c pelo estímulo com proteína recombinante produzida pelas linhagens de *E. coli* RIL e ClearColi, do ponto de vista da presença de LPS indutor de resposta imune.

1.6.2 Objetivos específicos

- i. Expressão da subunidade *EgAgB8/2* nas linhagens de *E. coli* RIL e ClearColi e purificação da proteína recombinante para caracterização imunológica em camundongos BALB/c.
- ii. Comparação da resposta imune celular gerada em camundongos BALB/c pelo estímulo dos esplenócitos com a subunidade *rEgAgB8/2* produzida pelas linhagens de *E. coli* RIL e ClearColi, com e sem tratamento para remoção de LPS.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação das soluções sem contaminação por endotoxinas

As vidrarias utilizadas tiveram suas endotoxinas inativadas pelo aquecimento à 180°C por 5 horas. Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água filtrada com Millipak® Gamma Gold Millipore 0,22 µm (Merck Millipore). Todas as medidas possíveis foram tomadas para que não houvesse prévia contaminação por endotoxinas nas soluções utilizadas para expressão e purificação da subunidade recombinante.

2.2 Transformação do plasmídeo contendo o gene codificador da subunidade *EgAgB8/2* em *E. coli* RIL e ClearColi

A sequência codificadora da subunidade *EgAgB8/2* do antígeno B de *E. granulosus* foi previamente clonada no vetor de expressão pGEX-4T-2 (GE Healthcare) (ROTT *et al.*, 2000). O plasmídeo produzido (pGEX-4T-2_B2) foi utilizado para transformar por eletroporação (KLEVANSKAA *et al.*, 2014) nas linhagens de *E. coli* BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL (Stratagene) e ClearColi™ BL21(DE3) (Lucigen) (RIL_B2 e ClearColi_B2, respectivamente).

2.3 Expressão e purificação da subunidade recombinante *rEgAgB8/2* em *E. coli* RIL e ClearColi

A expressão e a purificação das subunidades recombinantes foram realizadas de acordo com Lorenzatto *et al.* (2012), com algumas modificações. Colônias isoladas das linhagens RIL_B2 e ClearColi_B2 cultivadas em 500 mL de meio YT2X até apresentarem uma OD₆₀₀ entre 0,8 e 1,0. A expressão da subunidade recombinante foi induzida pela adição de 0,1 mM de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranoideo (IPTG) a 37°C por 3 h. As proteínas recombinantes das linhagens RIL_B2 e ClearColi_B2 fusionadas com glutathione S-transferase (GST) (rGST_B2_RIL e rGST_B2_ClearColi, respectivamente) foram purificadas por cromatografia de afinidade com a resina Gluthathione Sepharose 4B (GE Healthcare) e recuperadas pela clivagem com a protease trombina a 4°C por 12 h (rB2_RIL e rB2_ClearColi, respectivamente). As proteínas recombinantes eluídas rB2_RIL e rB2_ClearColi foram confirmadas por SDS-PAGE 12% e quantificadas utilizando o Qubit® Protein Assay Kit

(Life Technologies). rB2_RIL e rB2_ClearColi sofreram tratamento para remoção de LPS (rB2^{-LPS}_RIL e rB2^{-LPS}_ClearColi, respectivamente) por meio do sistema bifásico micelar-aquoso com Triton X-114 (MAGALHÃES *et al.*, 2007).

2.4 Avaliação da resposta imune celular em esplenócitos de camundongos BALB/c pela presença das citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-4

A avaliação da resposta imune celular foi feita de acordo com Virginio *et al.* (2014), com algumas modificações. Três camundongos machos BALB/c não imunizados foram eutanaziados e tiveram seus baços removidos, uma mistura dos esplenócitos dos três animais foi cultivado em meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 U de penicilina-estreptomicina/mL e 50 μ M de 2-mercaptoetanol. Os esplenócitos, em concentração de 5×10^6 células em um volume final de 500 μ L, foram estimulados com 10 μ L/mL das proteínas recombinantes rB2_RIL, rB2_ClearColi, rB2^{-LPS}_RIL e rB2^{-LPS}_ClearColi em 5% de CO₂ a 37°C por 72 h, em triplicata. Foram feitos dois controles positivos com o estímulo de 10 μ L/mL de Conavalina A e LPS. O controle negativo foi realizado pela ausência de estímulo nos esplenócitos. Os sobrenadantes da cultura celular estimulada foram testados para presença das citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-4 por ELISA de captura com o kit ELISA (BD Biosciences). Todos os procedimentos utilizando animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul seguindo guias internacionais para uso ético de animais na ciência para o projeto 15414_1, ao qual este Trabalho de Conclusão de Curso está vinculado.

2.5 Teste estatístico

As médias das concentrações das citocinas testadas foram obtidas a partir da triplicata técnica dos esplenócitos estimulados. O teste estatístico de análise de variância simples (GraphPad Prism 6) com um nível de significância $\leq 0,05$ foi realizado para comparação par a par das concentrações de cada citocina entre todos os estímulos realizados.

3. RESULTADOS

3.1 Expressão e purificação da subunidade *rEgAgB8/2* de *E. granulosus* em *E. coli* RIL e ClearColi

RIL_B2 (Figura 4) e ClearColi_B2 (Figura 5) apresentaram em SDS-PAGE 12% a presença de uma banda de indução, que se apresenta ausente no controle da linhagem não induzida. Após a interação da fração solúvel do extrato proteico dessa expressão com a resina de afinidade Gluthathione Sepharose 4B, foi observado para ambas as linhagens, em SDS-PAGE 12%, uma banda de aproximadamente 33 kDa na resina de afinidade. Esses resultados estão em concordância com a massa molecular esperada para a proteína de fusão rGST_B2, pois a proteína GST possui 25 kDa e a subunidade *EgAgB8/2* possui 8 kDa.

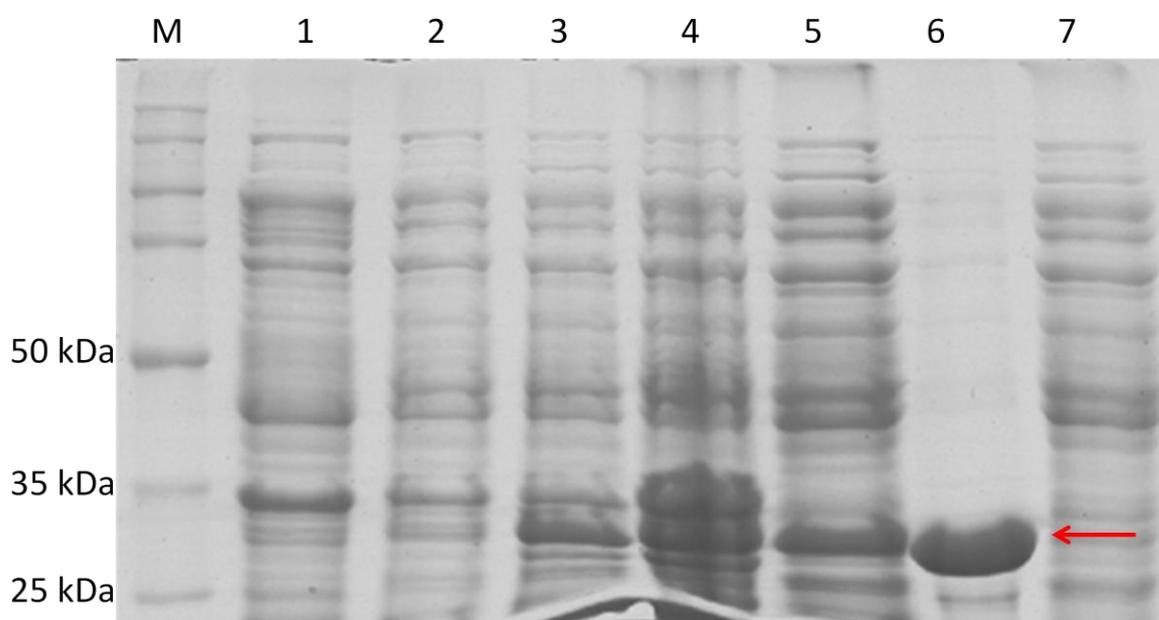


Figura 4: SDS-PAGE 12% corado com Comassie blue mostrando a expressão da subunidade *rEgAgB8/2* em *E. coli* RIL. Os extratos proteicos em diferentes condições foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, a seta indica a proteína de fusão rGST_B2_RIL com 33 kDa. **M:** Marcador de massa molecular Broad Range Protein Molecular Markers (Promega); **1:** Extrato proteico de RIL; **2:** Extrato proteico de RIL_B2 não-induzida à expressão de proteínas; **3:** Extrato proteico de RIL_B2 induzida à expressão de proteínas; **4:** Fração insolúvel do extrato proteico de RIL_B2 induzida à expressão de proteínas; **5:** Fração solúvel do extrato proteico de RIL_B2 induzida à expressão de proteínas; **6:** Resina de afinidade após a interação com a fração solúvel do extrato proteico de RIL_B2 induzida à expressão de proteínas; **7:** Fração solúvel do extrato proteico de RIL_B2 induzida à expressão de proteínas após a interação com a resina de afinidade.

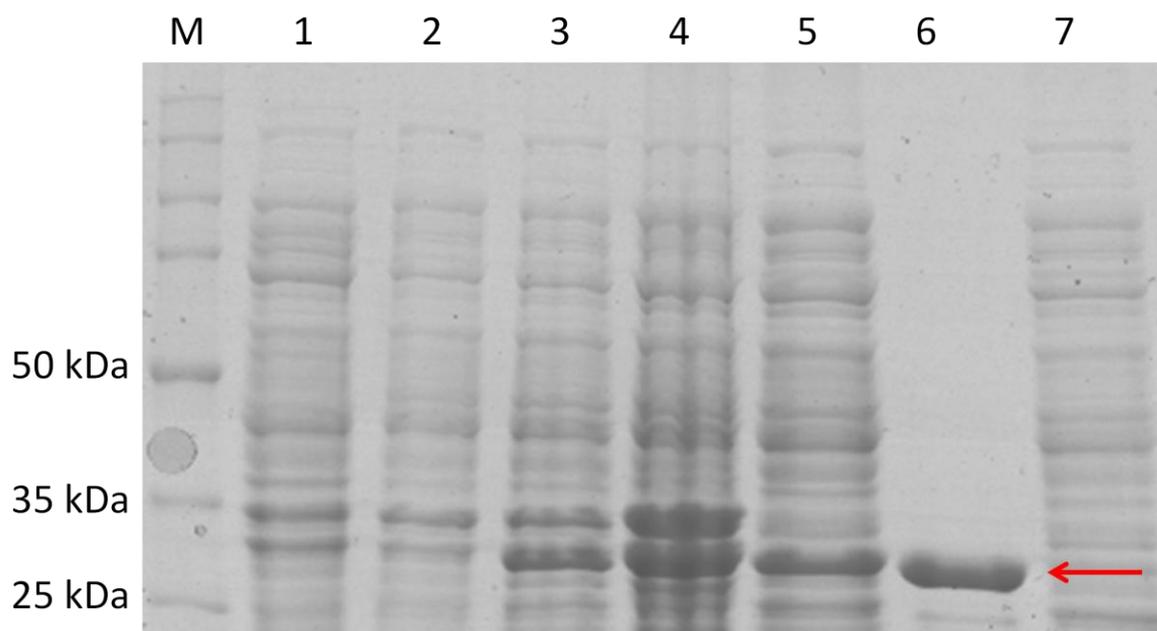


Figura 5: SDS-PAGE 12% corado com Comassie blue mostrando a expressão da subunidade *rEgAgB8/2* em *E. coli* ClearColi. Os extratos proteicos em diferentes condições foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, a seta indica a proteína de fusão rGST_B2_ClearColi com 33 kDa. **M:** Marcador de massa molecular Broad Range Protein Molecular Markers (Promega); **1:** Extrato proteico de ClearColi. **2:** Extrato proteico de ClearColi_B2 não-induzida à expressão de proteínas; **3:** Extrato proteico de ClearColi_B2 induzida à expressão de proteínas; **4:** Fração insolúvel do extrato proteico de ClearColi_B2 induzida à expressão de proteínas; **5:** Fração solúvel do extrato proteico de ClearColi_B2 induzida à expressão de proteínas; **6:** Resina de afinidade após a interação com a fração solúvel do extrato proteico de ClearColi_B2 induzida à expressão de proteínas; **7:** Fração solúvel do extrato proteico de ClearColi_B2 induzida à expressão de proteínas após a interação com a resina de afinidade.

As proteínas recombinantes rB2_RIL e rB2_ClearColi foram recuperadas da resina de afinidade pela clivagem com a protease trombina e foram eluídas 5 frações de 1 mL. As eluições, visualizadas em SDS-PAGE 12%, apresentaram, em ambas linhagens, uma massa molecular menor que o marcador de massa molecular de 10 kDa, o que está de acordo com a massa molecular esperada para a subunidade *EgAgB8/2*, de 8 kDa (Figura 6 para rB2_RIL e Figura 7 para rB2_ClearColi). A primeira fração da eluição da rB2_RIL apresentou rendimento de 4,42 mg por litro de cultura, enquanto que a primeira fração da eluição da rB2_ClearColi apresentou rendimento de 6,25 mg por litro de cultura.

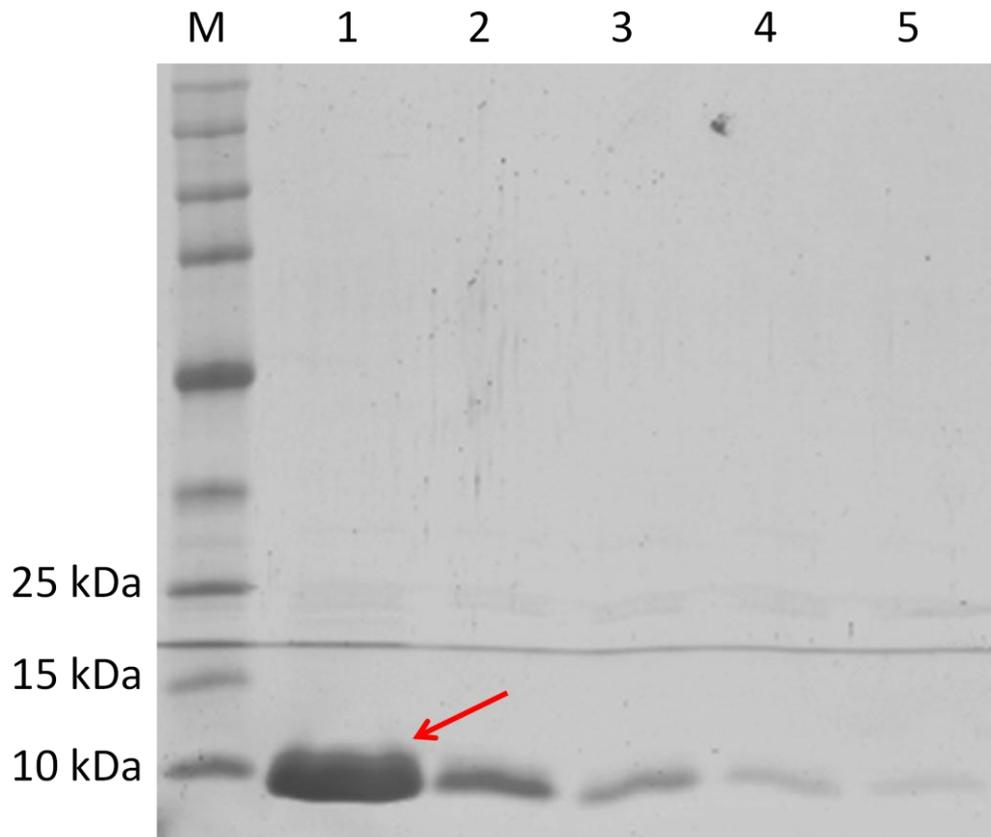


Figura 6: SDS-PAGE 12% corado com Comassie blue mostrando a subunidade recombinante rEgAgB8/2 produzida em *E. coli* RIL. A proteína recombinante rB2_RIL foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, a seta indica a primeira fração da eluição da rB2_RIL que apresenta concentração de 2,21 mg/mL. **M:** Marcador de massa molecular Broad Range Protein Molecular Markers (Promega); **1:** Primeira fração da eluição da rB2_RIL; **2:** Segunda fração da eluição da rB2_RIL; **3:** Terceira fração da eluição da rB2_RIL; **4:** Quarta fração da eluição da rB2_RIL; **5:** Quinta fração da eluição da rB2_RIL.

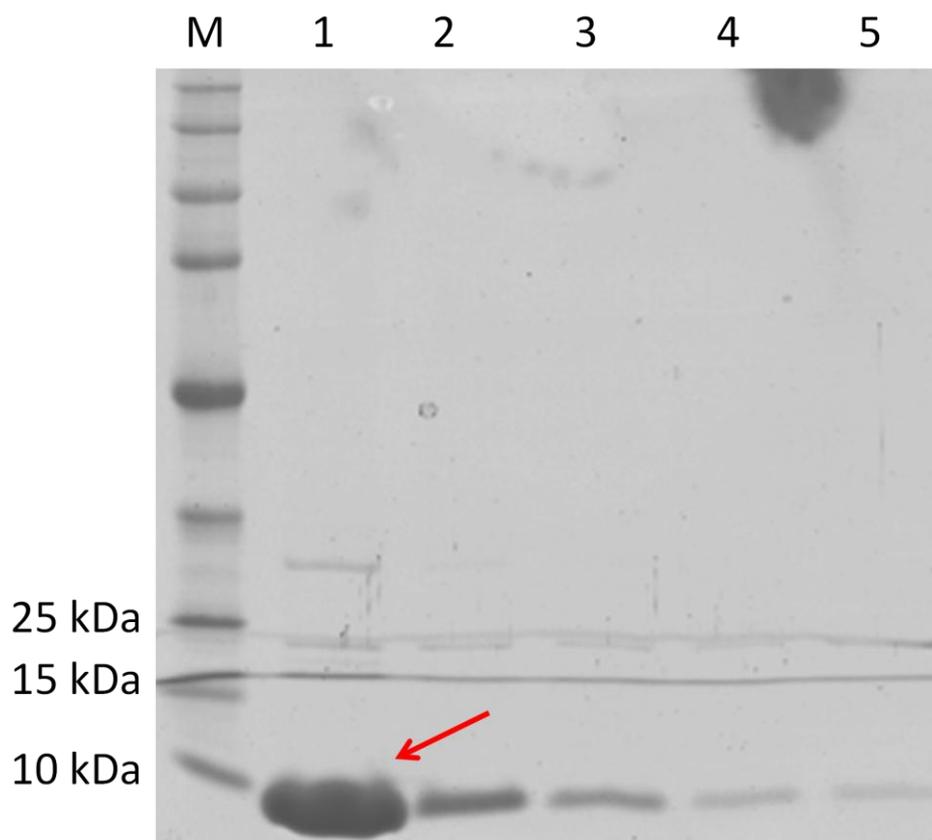


Figura 7: SDS-PAGE 12% corado com Comassie blue mostrando a subunidade recombinante rEgAgB8/2 em *E. coli* ClearColi. A proteína recombinante rB2_ClearColi foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, a seta indica a primeira fração da eluição da rB2_ClearColi que apresenta uma concentração de 3,28 mg/mL. **M:** Marcador de massa molecular Broad Range Protein Molecular Markers (Promega); **1:** Primeira fração da eluição da rB2_ClearColi; **2:** Segunda fração da eluição da rB2_ClearColi; **3:** Terceira fração da eluição da rB2_ClearColi; **4:** Quarta fração da eluição da rB2_ClearColi; **5:** Quinta fração da eluição da rB2_ClearColi.

O protocolo de remoção de LPS foi realizado com 300 μ L das primeiras frações das eluições da subunidade rB2_RIL (rB2^{-LPS}_RIL) e da rB2_ClearColi (rB2^{-LPS}_ClearColi). Foi possível visualizar as subunidades rB2^{-LPS}_RIL e rB2^{-LPS}_ClearColi em SDS-PAGE 12% (Figura 8), contudo houve perda de material no decorrer do processo. A subunidade rB2^{-LPS}_RIL apresentou uma concentração de 1,90 mg/mL, possuindo quantificação de 570 μ g, e a subunidade rB2^{-LPS}_ClearColi uma concentração de 3,08 mg/mL, possuindo quantificação de 924 μ g.

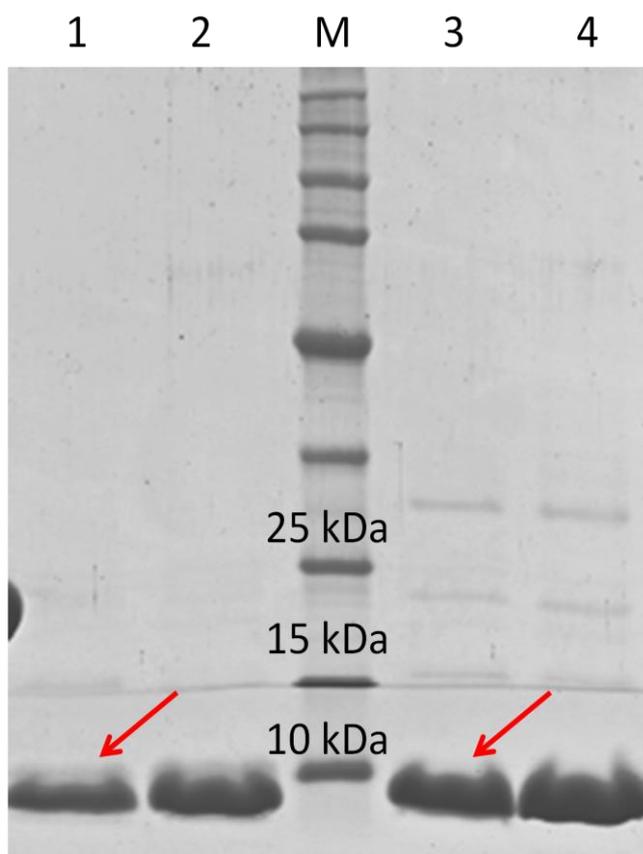


Figura 8: SDS-PAGE 12 % corado com Comassie blue mostrando a subunidade *rEgAgB8/2* após tratamento para remoção de LPS. As proteínas recombinantes *rEgAgB8/2* sem e com tratamento para remoção de LPS foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, as setas indicam as proteínas recombinantes *rB2^{-LPS}_RIL* e *rB2^{-LPS}_ClearColi* com concentrações de 1,90 mg/mL e 3,08 mg/mL, respectivamente. **1:** *rB2^{-LPS}_RIL*; **2:** *rB2_RIL*; **M:** Marcador de massa molecular Broad Range Protein Molecular Markers (Promega); **3:** *rB2^{-LPS}_ClearColi*; **4:** *rB2_ClearColi*.

3.2 Avaliação da resposta imune celular pela presença de IFN- γ , IL-10 e IL-4 secretado por esplenócitos estimulados com diferentes condições da subunidade *rEgAgB8/2*

A mistura dos esplenócitos dos três camundongos BALB/c apresentou uma quantidade inicial de 497,25 milhões de células. Os esplenócitos foram diluídos para 5×10^6 de células em um volume final de 500 μ L e foram estimulados de acordo com o item 2.3. A concentração das citocinas IFN- γ e IL-10 foram quantificadas (Tabela 1 e Tabela 2, respectivamente) em triplicata técnica para cada estímulo. Não foi identificada a presença da citocina IL-4 em nenhum dos estímulos realizados.

Tabela 1: Concentração de IFN- γ secretados por esplenócitos em diferentes estímulos. Esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados com a subunidade rEgAgB8/2 produzido pela *E. coli* RIL ou ClearColi, com e sem tratamento para remoção de LPS, com controles positivos estimulados com Concanalina A e LPS e controle negativo sem estímulo. Concentrações em pg/mL.

| Estímulos | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Média | Desvio Padrão |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|---------|---------------|
| Sem estímulo | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Concanalina A | 2273,45 | 2210,58 | 2187,42 | 2223,82 | 44,51 |
| LPS | 620,14 | 595,51 | 421,25 | 545,63 | 108,42 |
| rB2 ^{-LPS} _RIL | 424,92 | 267,20 | 109,48 | 267,20 | 157,72 |
| rB2_RIL | 768,67 | 212,05 | 281,91 | 420,88 | 303,21 |
| rB2_ClearColi | 208,01 | 448,08 | 696,25 | 450,78 | 244,12 |
| rB2 ^{-LPS} _ClearColi | 486,69 | 207,27 | 117,20 | 270,39 | 192,65 |

Tabela 2: Concentração de IL-10 secretados por esplenócitos em diferentes estímulos. Esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados com a subunidade rEgAgB8/2 produzido pela *E. coli* RIL ou ClearColi, com e sem tratamento para remoção de LPS, com controles positivos estimulados com Concanalina A e LPS e controle negativo sem estímulo. Concentrações em pg/mL.

| Estímulos | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 | Média | Desvio Padrão |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|---------|---------------|
| Sem estímulo | 54,00 | 6,80 | 102,85 | 54,55 | 48,03 |
| Concanalina A | 3732,85 | 2918,80 | 4200,00 | 3617,21 | 648,38 |
| LPS | 945,71 | 710,80 | 687,14 | 781,21 | 142,94 |
| rB2_RIL | 517,14 | 348,80 | 457,14 | 441,02 | 85,32 |
| rB2 ^{-LPS} _RIL | 332,85 | 136,80 | 275,71 | 248,45 | 100,83 |
| rB2_ClearColi | 630,00 | 418,80 | 548,57 | 532,45 | 106,51 |
| rB2 ^{-LPS} _ClearColi | 258,57 | 140,80 | 248,57 | 215,98 | 65,30 |

3.3 Comparação estatística das médias de produção de citocinas IFN- γ e IL-10 produzidos por esplenócitos em diferentes condições de estímulos da subunidade rEgAgB8/2

A análise de variância simples com nível de significância \leq a 0,05 realizado para as concentrações de IFN- γ obtidas nos diferentes estímulos apresentou diferença significativa entre as células estimuladas com Concanalina A e as células estimuladas com os outros estímulos. Não foi obtida nenhuma diferença significativa entre as células não estimuladas e estimuladas com LPS, rB2_RIL, rB2^{-LPS}_RIL, rB2_ClearColi e rB2^{-LPS}_ClearColi (Figura 9).

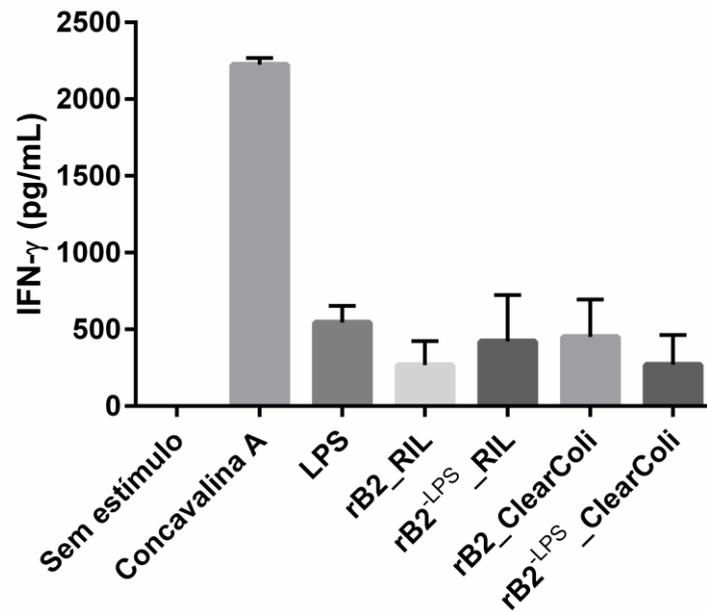


Figura 9: Gráfico da comparação das concentrações de IFN- γ secretadas pelos esplenócitos estimulados com diferentes condições da subunidade rEgAgB8/2. Há diferença significativa entre a concentração de IFN- γ secretado pelos esplenócitos estimulados com Concanalina A em comparação aos outros estímulos.

A análise de variância simples com nível de significância \leq a 0,05 realizado para as concentrações de IL-10 obtidas nos diferentes estímulos apresentou diferença significativa entre as células estimuladas com Concanalina A e as células estimuladas com os outros estímulos. Não foi obtida nenhuma diferença significativa entre as células não estimuladas e estimuladas com LPS, rB2_RIL, rB2^{-LPS}_RIL, rB2_ClearColi e rB2^{-LPS}_ClearColi (Figura 10).

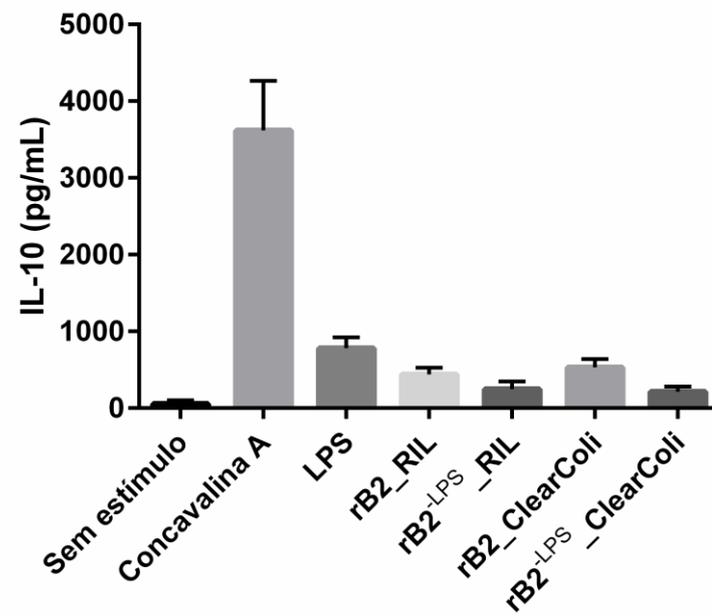


Figura 10: Gráfico da comparação das concentrações de IL-10 secretadas pelos esplenócitos estimulados com diferentes condições da subunidade rEgAgB8/2 . Há diferença significativa entre a concentração de IL-10 secretado pelos esplenócitos estimulados com Concanalina A em comparação aos outros estímulos.

4. DISCUSSÃO

As transformações das linhagens de *E. coli* RIL e ClearColi ocorreram com sucesso, apenas divergindo quanto ao tempo de multiplicação das colônias isoladas. A ClearColi_B2 apresentou, em placa de cultivo, um tempo dobrado de multiplicação em comparação a RIL_B2, como descrito pelo fabricante (Lucigen Corporation, <<http://lucigen.com/docs/manuals/MA145-ClearColi-BL21-DE3-Electocompetent-Cells.pdf>> acesso em 17/11/2014 20:45) Ambas as linhagens apresentaram uma proteína de fusão rGST_B2 com massa molecular entre os marcadores moleculares de 25 kDa e 35 kDa, confirmando a massa molecular esperada para a proteína de fusão rGST_B2, de 33 kDa, devido a massa molecular da GST ser 25 kDa e da subunidade *EgAgB8/2* ser 8 kDa.

A recuperação das subunidades rB2_RIL e rB2_ClearColi estão de acordo com a massa esperada de 8 kDa, pois se apresentam abaixo do marcador de massa molecular de 10 kDa, confirmando a correta purificação dessa subunidade. Contudo, a linhagem RIL apresentou uma produção de proteína relativamente baixa em relação ao normal esperado para a subunidade *rEgAgB8/2*, entre 6 e 10 mg/L (MONTEIRO *et al.*, 2008), apresentando uma produção de 4,42 mg por litro de solução de cultura. A linhagem ClearColi, por sua vez, apresentou uma produção de rB2_ClearColi dentro dos padrões, com 6,25 mg por litro de solução de cultura. Isso pode ser devido a clivagem incompleta pela protease trombina na resina de afinidade contendo rGST_B2_RIL (dados não mostrados).

As altas concentrações, tanto de IFN- γ como de IL-10, observadas nos sobrenadantes dos esplenócitos estimulados com Concanavalina A, assim como a ausência ou a baixa concentração dessas citocinas na condição sem estímulo, demonstram a correta realização dos estímulos nos esplenócitos e a correta análise da presença destas citocinas, pois os controles realizados estão de acordo com o esperado. A igualdade significativa da concentração de IFN- γ ou de IL-10 entre o sobrenadante dos esplenócitos estimulados com a rB2_RIL e a rB2_ClearColi se baseia na premissa de que o lipídeo IV_A, sintetizado pela linhagem ClearColi, é antigênico para camundongos assim como o LPS (MUROI *et al.*, 2006). Dessa forma, é possível concluir que não há diferença no nível de resposta imunológica celular desencadeada pela subunidade *rEgAgB8/2* produzida nas diferentes linhagens RIL e ClearColi em esplenócitos de camundongos BALB/c.

A igualdade estatística da concentração de IFN- γ e IL-10 secretadas pelos esplenócitos estimulados com as proteínas recombinantes nas diferentes condições rB2_RIL e rB2^{-LPS}_RIL

ou rB2_ClearColi e rB2^{-LPS}_ClearColi se deve ao fato da subunidade *EgAgB8/2* formar oligômeros que possuem um centro lipofílico (MONTEIRO *et al.*, 2007). A formação desses oligômeros, portanto, pode ter impedido a correta remoção dos contaminantes LPS ou lipídeo IV_A (para as linhagens RIL e ClearColi, respectivamente) através da metodologia de sistema bifásico micelar-aquoso (MAGALHÃES *et al.*, 2007). Dessa forma, a contaminação desses compostos lipídicos permaneceu e influenciou a resposta imune celular desencadeada nos esplenócitos de camundongos BALB/c.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho resultou nas seguintes conclusões:

- Não há diferença no nível de resposta imune celular desencadeada pela subunidade *rEgAgB8/2* produzida nas diferentes linhagens RIL e ClearColi em esplenócitos de camundongos BALB/c.
- Não há diferença no nível de resposta imune celular desencadeada pela subunidade *rEgAgB8/2* com e sem tratamento para remoção de LPS produzida na linhagem RIL.
- Não há diferença no nível de resposta imune celular desencadeado pela subunidade *rEgAgB8/2* com e sem tratamento para remoção de LPS produzida na linhagem ClearColi.

6. PERSPECTIVAS

Para uma melhor elucidação da real eficiência da remoção de LPS ou de lipídeo IV_A pelo sistema bifásico micelar-aquoso com Triton X-114, seria necessário repetir os estímulos aos esplenócitos com uma proteína recombinante que não possua caráter lipofílico.

7. BIBLIOGRAFIA

AKITA, H.; NAKASHIMA, N.; HOSHINO, T. Bacterial production of isobutanol without expensive reagents. **Applied microbiology and biotechnology**, 31 out 2014.

BAGHERI, S.; MOUSAVI GARGARI, S. L.; RASOOLI, I.; NAZARIAN, S.; ALERASOL, M. A C_{ss}A, C_{ss}B and LTB chimeric protein induces protection against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 308–14, [S.d.].

BOJKO, M.; OLCZAKA-PAJÓR, M.; TULEJA, U.; *et al.* Expression of three diadinoxanthin de-epoxidase genes of *Phaeodactylum tricoratum* in *Escherichia coli* Origami b and BL21 strain. **Acta biochimica Polonica**, v. 60, n. 4, p. 857–60, jan 2013.

CHOU, C. P. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 76, n. 3, p. 521–32, set 2007.

DAEGELEN, P.; STUĐIER, F. W.; LENSKI, R. E.; CURE, S.; KIM, J. F. Tracing ancestors and relatives of *Escherichia coli* B, and the derivation of B strains REL606 and BL21(DE3). **Journal of molecular biology**, v. 394, n. 4, p. 634–43, 11 dez 2009.

DAVTYAN, H.; GHOCHEKYAN, A.; HOVAKIMYAN, A.; *et al.* Immunostimulant patches containing *Escherichia coli* LT enhance immune responses to DNA- and recombinant protein-based Alzheimer's disease vaccines. **Journal of neuroimmunology**, v. 268, n. 1-2, p. 50–7, 15 mar 2014.

ECKERT, J.; DEPLAZES, P. Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 107–135, 15 jan 2004.

FERRER-MIRALLES, N.; DOMINGO-ESPÍN, J.; CORCHERO, J. L.; VÁZQUEZ, E.; VILLAVARDE, A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microbial cell factories**, v. 8, p. 17, jan 2009.

FORTERRE, P. Why are there so many diverse replication machineries? **Journal of molecular biology**, v. 425, n. 23, p. 4714–26, 29 nov 2013.

HUANG, C.-J.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 383–99, mar 2012.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–84, maio 2010.

KIM, B.-Y.; PARK, H. R.; SHIN, J.; *et al.* The Serine Protease Inhibitor, 4-(2-aminoethyl) Benzene Sulfonyl Fluoride Hydrochloride, Reduces Allergic Inflammation in a House Dust Mite Allergic Rhinitis Mouse Model. **Allergy, asthma & immunology research**, v. 6, n. 6, p. 558–66, nov 2014.

KIM, H.-R.; KIM, J.; CHOI, E.-J.; *et al.* Hyperoxygenation attenuated a murine model of atopic dermatitis through raising skin level of ROS. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e109297, jan 2014.

KLEVANSKAA, K.; BIER, N.; STINGL, K.; STRAUCH, E.; HERTWIG, S. PVv3, a new shuttle vector for gene expression in *Vibrio vulnificus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1477–81, fev 2014.

KUMAR R, ANGOV E, K. N. Potent malaria transmission blocking antibody responses elicited by. **Infect Immun.**, 2014.

KURYLO, KACPER, JAHANSHASI, SHAHRZAD, ZHU, WEIJIA, BROWN, ERIC D. AND LI, Y. A Dual Reporter System for Detecting RNA Interactions in Bacterial Cells. **ChemBioChem**, v. 0000, n. 00, p. 1–8, 2014.

LATA, K.; PAUL, K.; CHATTOPADHYAY, K. Functional characterization of *Helicobacter pylori* TlyA: pore-forming hemolytic activity and cytotoxic property of the protein. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 444, n. 2, p. 153–7, 7 fev 2014.

LIEBERS, V.; RAULF-HEIMSOTH, M.; BRÜNING, T. Health effects due to endotoxin inhalation (review). **Archives of toxicology**, v. 82, n. 4, p. 203–10, abr 2008.

LING, S.; XU, J.-W. Model organisms and traditional chinese medicine syndrome models. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2013, p. 761987, jan 2013.

LIU, C.-J.; CHENG, P.-Y.; HUANG, W.-C.; *et al.* Oral lovastatin attenuates airway inflammation and mucus secretion in ovalbumin-induced murine model of asthma. **Allergy, asthma & immunology research**, v. 6, n. 6, p. 548–57, nov 2014.

LORENZATTO, K. R.; MONTEIRO, K. M.; PAREDES, R.; *et al.* Fructose-bisphosphate aldolase and enolase from *Echinococcus granulosus*: genes, expression patterns and protein interactions of two potential moonlighting proteins. **Gene**, v. 506, n. 1, p. 76–84, 10 set 2012.

LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F. J. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 1–11, 2014.

MAGALHÃES, P. O.; LOPES, A. M.; MAZZOLA, P. G.; *et al.* Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques**, v. 10, n. 3, p. 388–404, jan 2007.

MAROUFI, Y.; GHAFARIFAR, F.; DALIMI, A.; SHARIFI, Z. Interferon-gamma and interleukin-4 patterns in BALB/c mice suffering from cutaneous leishmaniasis treated with cantharidin. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 7, n. 6, p. e10907, jun 2014.

MESSERSCHMIDT, S. J.; KEMTER, F. S.; SCHINDLER, D.; WALDMINGHAUS, T. Synthetic secondary chromosomes in *Escherichia coli* based on the replication origin of

chromosome II in *Vibrio cholerae*. **Biotechnology journal**, v. 0000, n. 00, p. 1–21, 31 out 2014.

MONTEIRO, K. M.; CARDOSO, M. B.; FOLLMER, C.; *et al.* Echinococcus granulosus antigen B structure: subunit composition and oligomeric states. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 3, p. e1551, jan 2012.

MONTEIRO, K. M.; SCAPIN, S. M. N.; NAVARRO, M. V. A. S.; *et al.* Self-assembly and structural characterization of Echinococcus granulosus antigen B recombinant subunit oligomers. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1774, n. 2, p. 278–85, fev 2007.

MONTEIRO, K. M.; ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. Recombinant subunits as tools for the structural and functional characterization of Echinococcus granulosus antigen B. **Experimental parasitology**, v. 119, n. 4, p. 490–8, ago 2008.

MUROI, M.; TANAMOTO, K. Structural regions of MD-2 that determine the agonist-antagonist activity of lipid IVA. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 9, p. 5484–91, 3 mar 2006.

PARK, B. S.; LEE, J. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Experimental & molecular medicine**, v. 45, n. 12, p. e66, jan 2013.

QIU, S.; LAI, L. Biochemical and Biophysical Research Communications Antibacterial properties of recombinant human non-pancreatic secretory phospholipase A 2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 441, n. 2, p. 453–456, 2013.

RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual review of biochemistry**, v. 71, p. 635–700, jan 2002.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 5, n. April, p. 172, jan 2014.

ROTT, M. B.; FERNÁNDEZ, V.; FARIAS, S.; *et al.* Comparative analysis of two different subunits of antigen B from Echinococcus granulosus: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. **Acta tropica**, v. 75, n. 3, p. 331–40, 31 maio 2000.

SANCHO, P.; TEJEDOR, C.; SIDHU-MUÑOZ, R. S.; FERNÁNDEZ-LAGO, L.; VIZCAÍNO, N. Evaluation in mice of *Brucella ovis* attenuated mutants for use as live vaccines against *B. ovis* infection. **Veterinary research**, v. 45, p. 61, jan 2014.

SANCINI, G.; FARINA, F.; BATTAGLIA, C.; *et al.* Health Risk Assessment for Air Pollutants: Alterations in Lung and Cardiac Gene Expression in Mice Exposed to Milano Winter Fine Particulate Matter (PM_{2.5}). **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e109685, jan 2014.

SCIOR, T.; ALEXANDER, C.; ZAEHRINGER, U. Reviewing and identifying amino acids of human, murine, canine and equine TLR4 / MD-2 receptor complexes conferring endotoxic innate immunity activation by LPS/lipid A, or antagonistic effects by Eritoran, in contrast to species-dependent modulation by li. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 5, n. February, p. e201302012, jan 2013.

VIRGINIO, V. G.; GONCHOROSKI, T.; PAES, J. A.; *et al.* Immune responses elicited by *Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant antigens and DNA constructs with potential for use in vaccination against porcine enzootic pneumonia. **Vaccine**, v. 32, n. 44, p. 5832–8, 7 out 2014.

VIRGINIO, V. G.; HERNÁNDEZ, A.; ROTT, M. B.; *et al.* A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. **Clinical and experimental immunology**, v. 132, n. 2, p. 309–15, maio 2003.

WAWEGAMA, N. K.; BROWNING, G. F.; KANCI, A.; MARENDA, M. S.; MARKHAM, P. F. Development of a recombinant protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 21, n. 2, p. 196–202, fev 2014.

YADAV, S. K.; SAHOO, P. K.; DIXIT, A. Characterization of immune response elicited by the recombinant outer membrane protein OmpF of *Aeromonas hydrophila*, a potential vaccine candidate in murine model. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 3, p. 1837–48, mar 2014.

ZAFAR, M.; AHMED, S.; KHAN, M. I. M.; JAMIL, A. Recombinant expression and characterization of a novel endoglucanase from *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 5, p. 3295–302, maio 2014.