

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

THATIANA FARIAS CAVALCANTE

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE IRISINA CANINA EM *Escherichia coli***

MANAUS-AM

2023

THATIANA FARIAS CAVALCANTE

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE IRISINA CANINA EM *Escherichia coli***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção de título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho

MANAUS-AM

2023

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C376c Cavalcante, Thatiana Farias  
Clonagem e expressão de irisina canina em Escherichia coli /  
Thatiana Farias Cavalcante . 2023  
58 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal  
do Amazonas.

1. Irisina canina. 2. Escherichia coli. 3. Expressão . 4. Proteína  
heteróloga . I. Astolfi Filho, Spartaco. II. Universidade Federal do  
Amazonas III. Título

**Dedico este trabalho aos meus pais,  
minha fonte de inspiração e meu maior  
exemplo de força e coragem.**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Spartaco Astolfi, por me receber como aluna de mestrado em seu laboratório, por todos os ensinamentos. Pela sua dedicação e paciência durante o projeto. Para mim, foi uma honra tê-lo como mentor.

À irmã científica, Kerollen Runa, pelo auxílio e conhecimentos compartilhados.

À Dra. Ellen Bethleen, pelo apoio, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos pesquisadores, Dra. Enedina Assunção, Dra. Isabelle Cordeiro, Dr. Edmar Vaz e Me. Júlio Nino, pelo auxílio e boa vontade em ensinar. Muito obrigada pelo precioso apoio.

Aos colegas doutorandos, mestrandos e técnicos do laboratório. Em especial, Leissandra, Samanta, Ingrid, Michele, Diego, Felipe, Genilton, Minerval, Patrícia, Elza e Carmen.

Aos colegas, Jimmy e Alex Johan, pelo auxílio e boa vontade em partilhar conhecimento.

Agradeço a coordenação do programa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante o mestrado.

## **AGRADECIMENTOS PESSOAIS**

Agradeço, antes de tudo, a Deus, por ter me dado força para vencer as dificuldades e continuar a jornada. Por ter me mostrado a luz do caminho nos momentos de aflição.

Agradeço aos meus pais, Sebastiana Martins e Francisco Carlos, por acreditarem em mim. Por serem minha âncora e porto seguro; e por todo esforço investido na minha educação.

Agradeço aos meus irmãos, Leandro Farias e Luana Farias, por todo auxílio e atenção dedicada quando eu precisei.

Ao meu companheiro de jornada, Fabiano Pinheiro, que acima de tudo é um grande amigo, sempre presente nos momentos difíceis. Pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

À grande amiga, Ana Carla, por sempre me ouvir, pelo ombro amigo, e por entender os momentos de ausência.

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

**Não tentes ser bem-sucedido,  
tenta antes ser um homem de valor.**

**Albert Einstein**

## RESUMO

**Introdução:** A irisina é uma proteína produzida de modo endógeno quando há estímulo físico contínuo. É produto da clivagem da proteína transmembrana fibronectina tipo III contendo o domínio 5 (FNDC5). Além do peptídeo sinal e da porção C-terminal, a FNDC5 tem uma região transmembrana e o domínio irisina. O exercício físico tem ação direta na síntese proteica, uma vez que, ativa a expressão do gene PGC1- $\alpha$  que induz a síntese da proteína FNDC5 com consequente liberação da irisina. No tecido adiposo age positivamente sobre a molécula UCP1, levando ao aumento da densidade mitocondrial, alto consumo de oxigênio e mudança das características fenotípicas dos adipócitos brancos para bege. Essas características estão associadas ao emagrecimento, melhora da resistência à insulina e regressão da síndrome metabólica. No sistema nervoso central promove a sobrevivência, manutenção e função das células neurais. Em cães, assim como em humanos, a obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento de disfunções metabólicas como, por exemplo, diabetes mellitus, perfis lipídicos alterados e hipertensão. A disfunção cognitiva canina afeta cerca de 60 % dos cães mais idosos, e está relacionada com o depósito de moléculas beta-amilóide. Visando futuro desenvolvimento um medicamento para tratamento dessas disfunções caninas, esse projeto tem como objetivo a clonagem e expressão da sequência codificadora de irisina canina em *Escherichia coli*. **Material e Métodos:** A sequência gênica da proteína foi selecionada a partir do banco de dados UniProt. O alinhamento da sequência a fim de analisar a similaridade entre humanos e cães foi feito utilizando o programa Blast-p. Uma vez selecionada a sequência, o gene foi desenhado e encomendo para síntese química com códons preferenciais de *E.coli* e clonado no vetor pUC-18. A sequência de irisina portadora de sítios das enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* nas extremidades foi subclonada nos sítios das mesmas enzimas no vetor de expressão pDMU01, resultando no plasmídeo recombinante pTI01. Para transformação e expressão do gene o pTI01 foi introduzido por eletroporação na linhagem de *E. coli DH5 $\alpha$ F'Iq*. Uma colônia recombinante foi inoculada em 50 mL de meio Luria Bertani contendo ampicilina 100 ug/mL e cultivada a 37 °C, rotação de 150 rpm por 32 h. Quando a cultura atingiu 0,5 OD<sub>600</sub>/mL a expressão foi induzida adicionando-se IPTG para a concentração final de 1 mM. Durante o crescimento foram coletadas alíquotas em espaços de tempo específicos para medida da absorbância e análise da proteína recombinante por eletroforese *SDS-PAGE*. **Resultados e discussão:** A digestão do vetor pUC18-IRISINA contendo o gene de expressão, assim como do vetor de expressão pDMU01 com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* foi eficientemente realizada. A ligação do gene ao plasmídeo pDMU01 foi confirmada por digestão enzimática utilizando as respectivas enzimas, tendo sido possível observar em gel de agarose a liberação de um fragmento de 432pb do PTI01 referente a região codificadora da irisina. A expressão gênica foi confirmada através de gel *SDS-PAGE* onde observou-se uma banda de aproximadamente 17kDa correspondente à massa molecular da irisina canina.

**Palavras chaves:** Irisina canina, *Escherichia coli*, Expressão, Proteína heteróloga.



## ABSTRACT

**Introduction:** Irisin is an endogenously produced protein upon continuous physical stimulation. It is a product of the cleavage of fibronectin type III transmembrane protein containing domain 5 (FNDC5). In addition to the signal peptide and the C-terminal portion, FNDC5 has a transmembrane region and the irisin domain. Physical exercise has a direct action on protein synthesis, since it activates the expression of the PGC1- $\alpha$  gene that induces the synthesis of the FNDC5 protein with consequent release of irisin. In adipose tissue, it acts positively on the UCP1 molecule, leading to increased mitochondrial density, high oxygen consumption and a change in the phenotypic characteristics of white adipocytes to beige. These characteristics are associated with weight loss, improved insulin resistance and regression of metabolic syndrome. In the central nervous system it promotes the survival, maintenance and function of neural cells. In dogs, as in humans, obesity is a risk factor for the development of metabolic dysfunctions such as diabetes mellitus, altered lipid profiles and hypertension. Canine cognitive dysfunction affects about 60% of older dogs, and is related to the deposition of beta-amyloid molecules. Aiming at the future development of a drug to treat these canine dysfunctions, this project aims to clone and express the coding sequence of canine irisin in *Escherichia coli*. **Material and Methods:** The gene sequence of the protein was selected from the UniProt database. The sequence alignment in order to analyze the similarity between humans and dogs was done using the Blast-p program. Once the sequence was selected, the gene was designed and ordered for chemical synthesis with *E. coli* preferred codons and cloned into the pUC-18 vector. The irisin sequence carrying NdeI and BamHI restriction enzyme sites at the ends was subcloned into the sites of the same enzymes in the expression vector pDMU01, resulting in the recombinant plasmid pTI01. For transformation and gene expression pTI01 was introduced by electroporation into *E. coli* strain DH5 $\alpha$ F'Iq. A recombinant colony was inoculated into 50 mL of Luria Bertani medium containing ampicillin 100 ug/mL and grown at 37 °C, 150 rpm rotation for 32 h. When the culture reached 0.5 OD<sub>600</sub>/mL expression was induced by adding IPTG to the final concentration of 1 mM. During growth aliquots were collected at specific time slots for absorbance measurement and analysis of recombinant protein by SDS-PAGE electrophoresis. **Results and discussion:** Digestion of the pUC18-IRISINA vector containing the expression gene as well as the pDMU01 expression vector with the restriction enzymes NdeI and BamHI was efficiently performed. The binding of the gene to the pDMU01 plasmid was confirmed by enzymatic digestion using the respective enzymes, and it was possible to observe in agarose gel the release of a 432pb fragment of pTI01 referring to the irisin coding region. Gene expression was confirmed by SDS-PAGE gel where a band of approximately 17kDa corresponding to the molecular mass of canine irisin was observed.

**Key words:** Canine irisin, *Escherichia coli*, Expression, Heterologous protein.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> (A) estrutura da proteína transmembrana e sua ativação por proteólise para liberação da irisina. (B) Sequência de aminoácidos da irisina canina .....	17
<b>Figura 2-</b> Estrutura cristalográfica da irisina .....	18
<b>Figura 3-</b> Exercício em longo prazo gera resposta positiva sobre a expressão de PGC1- $\alpha$ e UCP1.....	20
<b>Figura 4-</b> A expressão do cAMP ativa a lipase hormônio sensível aumentando a lipólise e diminuindo o acúmulo de lipídio .....	21
<b>Figura 5-</b> O exercício físico induz a expressão de FNDC5, precursor da irisina. Após proteólise, a irisina interage com os neurônios .....	23
<b>Figura 6-</b> Esquema demonstrando as principais características de um vetor de expressão .....	27
<b>Figura 7-</b> Regulação operon <i>lac</i> .....	29
<b>Figura 8-</b> Mapa físico do plasmídeo pUC18 contendo o gene da irisina .....	33
<b>Figura 9-</b> Mapa físico do plasmídeo pDMU01 contendo o gene da GFP.....	34
<b>Figura 10-</b> Desenho da sequência gênica para clonagem e expressão .....	44
<b>Figura 11-</b> Estrutura cristalográfica e modelagem da irisina.....	45
<b>Figura 12-</b> Análise de restrição dos vetores pDMU01 e pUC18-IRISINA.....	46
<b>Figura 13-</b> Perfil eletroforético do produto da purificação do vetor de clonagem e expressão pDMU01 e do gene que codifica a proteína irisina .....	47
<b>Figura 14-</b> Perfil eletroforético da restrição enzimática do vetor pTI01.....	48
<b>Figura 15-</b> Perfil eletroforético SDS-PAGE da indução em <i>DH5<math>\alpha</math>F'Iq</i> .....	49
<b>Figura 16-</b> Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% da fração insolúvel da indução em célula <i>DH5<math>\alpha</math>F'Iq</i> .....	50
<b>Figura 17-</b> Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% da fração solúvel da indução em célula <i>DH5<math>\alpha</math>F'Iq</i> .....	51

<b>Figura 18-</b> Perfil cromatográfico da purificação da proteína heteróloga irisina .....	52
<b>Figura 19-</b> Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 12% das frações da purificação da proteína por cromatografia de afinidade .....	52
<b>Figura 20-</b> Perfil do Western Blotting das frações da proteína purificada .....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Linhagem e genótipo da célula <i>E.coli</i> utilizada no presente estudo-----	31
<b>Tabela 2</b> - Meios de cultura utilizados e suas respectivas composições-----	34
<b>Tabela 3</b> - Enzimas de restrição utilizadas neste trabalho-----	34
<b>Tabela 4</b> - Sequências que codificam FNDC5/IRISINA-----	42

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A $\beta$  – Beta-amilóide

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta de busca e Alinhamento básico local)

cAMP – Adenosina monofosfato cíclico

CCD – Disfunção cognitiva canina

CREB – Proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP

DA - Doença de Alzheimer

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DM – Diabetes Mellitus

FNDC5 - Proteína transmembrana fibronectina tipo III contendo domínio 5

GFP - *Green Fluorescent Protein*

IDDM – Diabetes Mellitus insulino-dependente

IPTG - Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida

kDa - Quilodalton

L - Litro

LB - Meio Luria-Bertani

mM - Milimolar

M - Molar

NaCl – Cloreto de sódio

NIDDM – Diabetes Mellitus não insulino-dependente

$\mu$ L - Microlitro

ng - Nanograma

°C - Graus celsius

OD 600- Densidade ótica

PBS – Tampão fosfato-salino

PGC1- $\alpha$  - Coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma

pb - Par de bases

PMSF - Fluoreto de fenilmetanossulfonil

PKA – Proteína quinase A

SDS - Dodecil sulfato de sódio

UCP-1 – Proteína desacopladora 1

V - Volt

W - Watt

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 Irisina humana: aspectos gerais .....	17
2.2 Regulação da expressão de FNDC5/irisina .....	19
2.3 Fisiologia de redução da obesidade e resistência à insulina mediadas pelo hormônio irisina.....	20
2.4 Efeitos neurais da irisina.....	21
2.5 Disfunção metabólica canina.....	23
1. 6 Clonagem e expressão gênica.....	25
2.7 Vetor de expressão.....	26
2.8 Hospedeiros bacterianos .....	27
2.9 Sistema de expressão heteróloga em Escherichia coli baseados no operon lac .....	28
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	30
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	31
4. 1 Objetivo geral .....	31
4. 2 Objetivos específicos .....	31
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
5.2 Material.....	32
5.2.1 Linhagens de E. coli utilizadas. ....	32
5.2.2 Vetores.....	33
5.2.3 Meios de cultura .....	35
5.2.4 Enzimas .....	35
5.2.5 Reagentes e outros materiais .....	36
5.3 Métodos .....	36
5.3.1 Estudo da sequência de aminoácidos da proteína.....	36
5.3.2 Design da sequência gênica.....	36
5.3.3 Modelagem molecular .....	36
5.3.4 Isolamento da sequência da irisina .....	36
5.3.5 Ligação do gene da irisina ao vetor pDMU01.....	37
5.3.6 Transformação genética de E. coli Dh5 $\alpha$ F'Iq por eletroporação .....	37
5.3.7 Indução da expressão do gene de irisina canina .....	38

5.3.8 Análise do produto expresso por SDS-PAGE.....	38
5.3.9 Obtenção dos extratos de proteínas solúveis e insolúveis e análise por SDS-PAGE.....	39
5.3.10 Purificação da proteína por cromatografia de afinidade.....	40
5.3.11 Western Blotting.....	40
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
6.1 Estudo da sequência de aminoácidos da proteína.....	42
6.2 Sequência gênica para clonagem e expressão .....	43
6.3 Modelagem molecular .....	44
6.4 Isolamento do gene de irisina sintético e do arcabouço do vetor pDMU01 por restrição enzimática e purificação das regiões .....	45
6.5 Transformação genética do produto da ligação em E. coli DH5 $\alpha$ F'Iq.....	47
6.6 Análise por restrição enzimática do vetor pTI01.....	48
6.7 Indução da expressão do gene heterólogo e análise do produto por SDS-PAGE .....	47
6.8 Obtenção dos extratos de proteínas solúveis e insolúveis e análise por SDS-PAGE.....	49
6.9 Purificação da proteína por cromatografia de afinidade.....	50
6.10 Western Blotting.....	52
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Os avanços na biotecnologia e na bioengenharia direcionam o surgimento de novas ferramentas de engenharia genética. A engenharia metabólica recombinante é uma extensão da engenharia genética que permite a produção de moléculas usando o maquinário de uma célula viva. Um exemplo de biomoléculas produzidas em laboratório são as proteínas recombinantes, que podem ser usadas em diversas aplicações (SANTOS & WIETHÖLTER, 2021).

Citocinas são moléculas proteicas heterogêneas sinalizadoras secretadas por células que são capazes de modular respostas celulares (VERELLA, FORTE, 2001). As citocinas produzidas durante o exercício físico pelo músculo estriado esquelético são chamadas de miocinas. A ação mecânica voluntária induz maior síntese dessas moléculas, capazes de modular respostas biológicas relacionadas à homeostase do organismo. (GLEESON *et al.*, 2011).

Os principais benefícios conhecidos do exercício físico são mediados pelo coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC1- $\alpha$ ). A expressão de PGC1- $\alpha$  estimula a síntese da proteína desacopladora 1 (UCP-1) nos adipócitos brancos, aumentando a densidade mitocondrial nas células, fator importante para a termogênese (PUIGSERVER *et al.*, 1998).

Segundo Boström, et al. (2012) a expressão de PGC1- $\alpha$  no músculo estimula a síntese da proteína transmembrana fibronectina tipo III contendo domínio 5 (FNDC5). Uma vez expressa, é clivada, liberando na circulação o hormônio denominado de irisina. Essa proteína atua nos adipócitos brancos induzindo UCP-1, que está relacionada com a termogênese, e a conversão de tecido adiposo branco em tecido adiposo marrom.

A obesidade canina é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas em cães. O acúmulo excessivo de gordura pode levar ao surgimento de dislipidemias, hipertensão arterial e resistência à insulina. Tais fatores influenciam na longevidade e qualidade de vida, com isso, esse trabalho tem como objetivo a clonagem e expressão de irisina canina, a fim de dá subsídio para futuros tratamentos de disfunções metabólicas em cães.

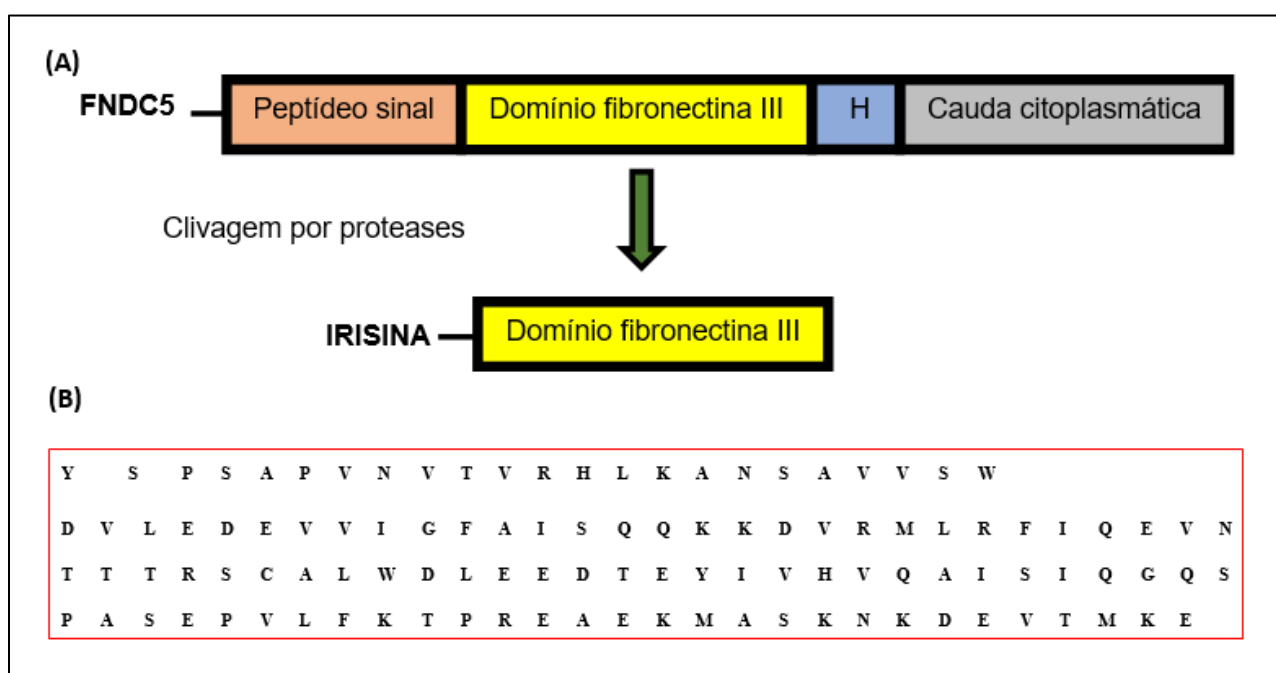
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Irisina humana: aspectos gerais

A primeira descrição da irisina foi feita por uma equipe de pesquisadores liderada por Boström, em 2012. Os quais expuseram a existência de um novo peptídeo secretado por células musculares de camundongos (BOSTRÖM, 2012). É um hormônio que vem sendo estudado por interagir com várias funções endócrinas e metabólicas. Seu receptor específico ainda é desconhecido, o que implica em um campo de estudo importante, uma vez que pode ser um potencial agente terapêutico (MAHGOUB *et al.*, 2018).

Irisina é uma proteína composta por 99 aminoácidos, e compreende a parte funcional que é liberada na circulação após a proteólise da proteína transmembrana fibronectina tipo III contendo domínio 5 (FNDC5). A estrutura molecular de FNDC5 compreende um peptídeo sinal N-terminal, um domínio FNIII, um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática (FIGURA 1) (WRANN, 2015).

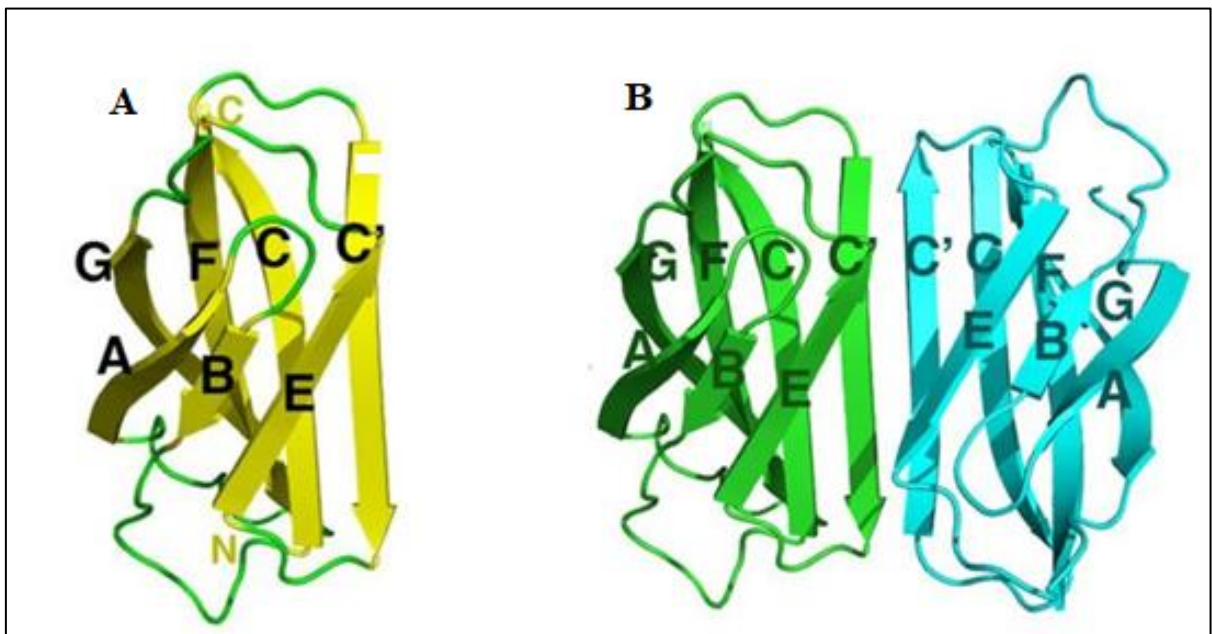
**Figura 1.** Representação esquemática da estrutura molecular da proteína FNDC5. (A) estrutura da proteína transmembrana e sua ativação por proteólise para liberação da irisina. (B) Sequência de aminoácidos de FNDC5 canino



Fonte: Adaptado de MAHGOUB *et al.*, 2018.

Estudos bioquímicos e cristalográficos demonstram que a forma secretada da irisina constitui um homodímero formado por interações contínuas de folhas  $\beta$ . Na forma não dimérica, a organização estrutural da proteína demonstra que uma folha  $\beta$  de quatro filamentos se compacta com uma folha  $\beta$  de três filamentos (FIGURA 2. A). A formação do dímero ocorre pela interação entre as fitas C das subunidades (FIGURA 2. B) (SCHUMACHER *et al.*, 2013; WASEEN, 2022).

**Figura 2.** Estrutura da irisina baseada na cristalografia. (A) Folhas  $\beta$  que formam uma subunidade do dímero. (B) Interação das subunidades e formação do dímero.



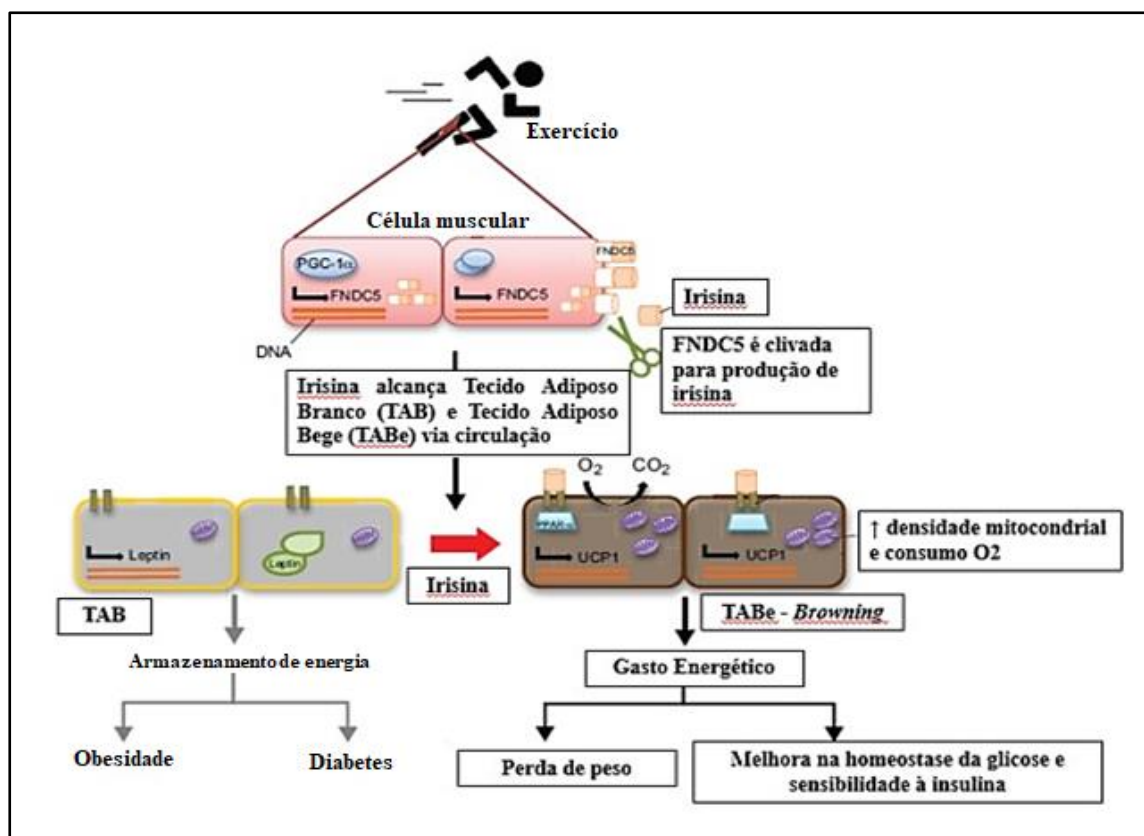
Fonte: Adaptado de Schumacher *et al.*, 2013.

É relatado que os níveis sanguíneos de irisina aumentam após exercício físico. Em camundongos após três semanas corridas os níveis plasmáticos de irisina aumentaram significativamente em 65%, e em humanos adultos a quantidade plasmática de irisina duplicou após 10 semanas de exercício físico. O aumento dos níveis plasmáticos em ambas as espécies é quase que proporcional ao aumento do mRNA nos músculos (BOSTRÖM, 2012). Há uma grande similaridade da sequência da parte secretada da FNDC5 entre espécies, estudos demonstram que em ratos e humanos a similaridade é de 100% (BOSTRÖM, 2012).

## 2.2 Regulação da expressão de FNDC5/irisina

O exercício físico acentuado induz o aumento da síntese de mRNA que será traduzido e expresso na proteína PGC1- $\alpha$  no músculo esquelético (PILEGAARD *et al.*, 2003). Como fator de transcrição, PGC1- $\alpha$  induz a expressão da proteína transmembrana FNDC5 com consequente liberação do hormônio irisina (HUH *et al.*, 2012). Diante disso, a irisina exerce regulação sobre a expressão da molécula UCP1 que aumenta a densidade mitocondrial levando a conversão das células adipócitas brancas em tecido adiposo bege, como mostrado na Figura 3 (BOSTRÖM, 2012; RIVADA *et al.*, 2013). Porém, há estudos controversos a respeito da indução da expressão de FNDC5, assim como do aumento da concentração plasmática da irisina no plasma a partir da atividade física, ou de uma associação positiva ou negativa entre os dois. Isso pode ser por conta dos diferentes tipos de exercícios realizados nos estudos, assim como, na variação da intensidade e duração das séries dos exercícios (MAHGOUB, 2018).

**Figura 3.** Exercício a longo prazo gera resposta positiva sobre a expressão de PGC1- $\alpha$  e UCP1. PGC1- $\alpha$  induz a expressão de FNDC5 na membrana celular, que é então clivada liberando na circulação a irisina. O hormônio alcança o tecido adiposo via circulação, e tem ação de alterar o fenótipo das células adipócitas, e com isso, aumentar o gasto energético ocasionando perda de peso e melhora na homeostase da glicose e sensibilidade à insulina

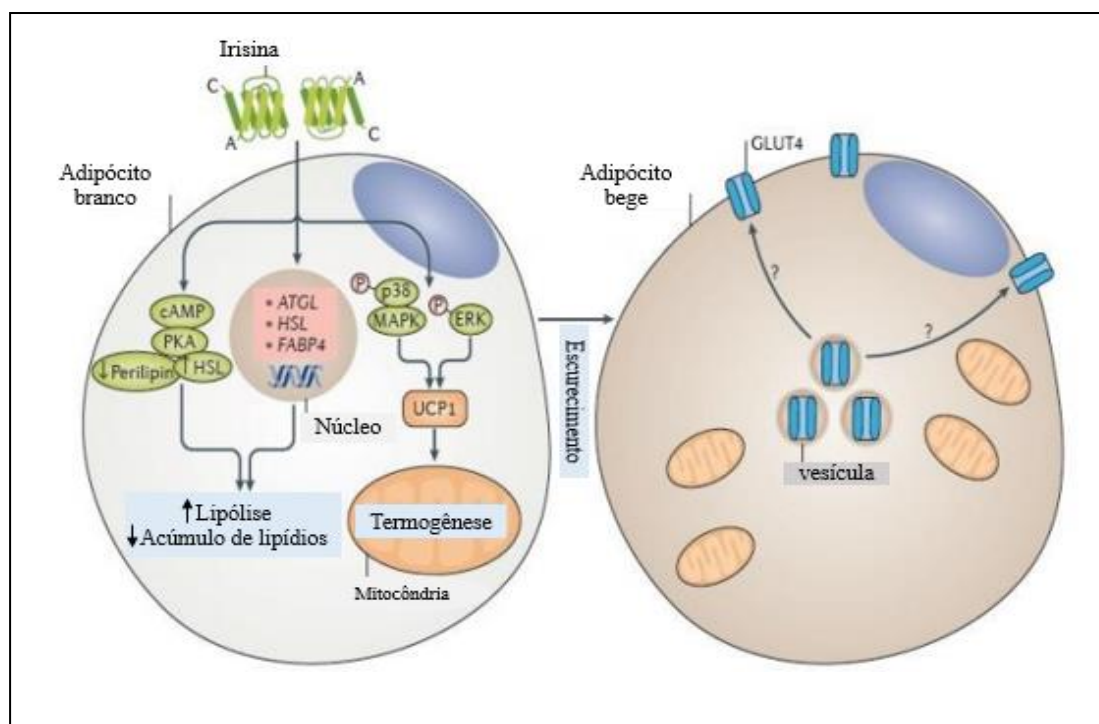


Fonte: Adaptado de MORTON *et al.*, 2016.

### 2.3 Fisiologia de redução da obesidade e resistência à insulina mediadas pelo hormônio irisina.

A liberação da irisina na corrente sanguínea aumenta a expressão de *UCP1*, elevando a transcrição e tradução de vários genes mitocondriais que estão relacionados com o aumento do consumo de  $O_2$ . Além disso, observa-se que há redução de gordura, e modificação do fenótipo das células de branco para bege, levando ao melhoramento da sensibilidade à insulina, conforme demonstra a Figura 4 (BOSTRÖM, 2012).

**Figura 4.** A expressão do *cAMP* ativa a lipase hormônio sensível aumentando a lipólise e diminuindo o acúmulo de lipídio. Há diferenciação fenotípica de adipócitos branco em adipócito bege, e expressão do receptor de insulina *GLUT4*.



Fonte: PERAKAKIS *et al.*, 2017.

A molécula UCP1 é uma proteína mitocondrial que está intimamente ligada com a termogênese. *PGC1- $\alpha$*  é um co-ativador que regula a expressão de outros genes, como *FNDC5* e *UCP1*, portanto ligado a regulação da biogênese mitocondrial (ZHANG *et al.*, 2013). Há evidências de que a irisina converte as células adipócitas branca em células adipócitas bege, e induz a expressão de betatrofina, o que seria uma fonte para explicar a melhora da sensibilidade à insulina induzida pela irisina (ZHANG *et al.*, 2013).

## 2.4 Efeitos neurais da irisina

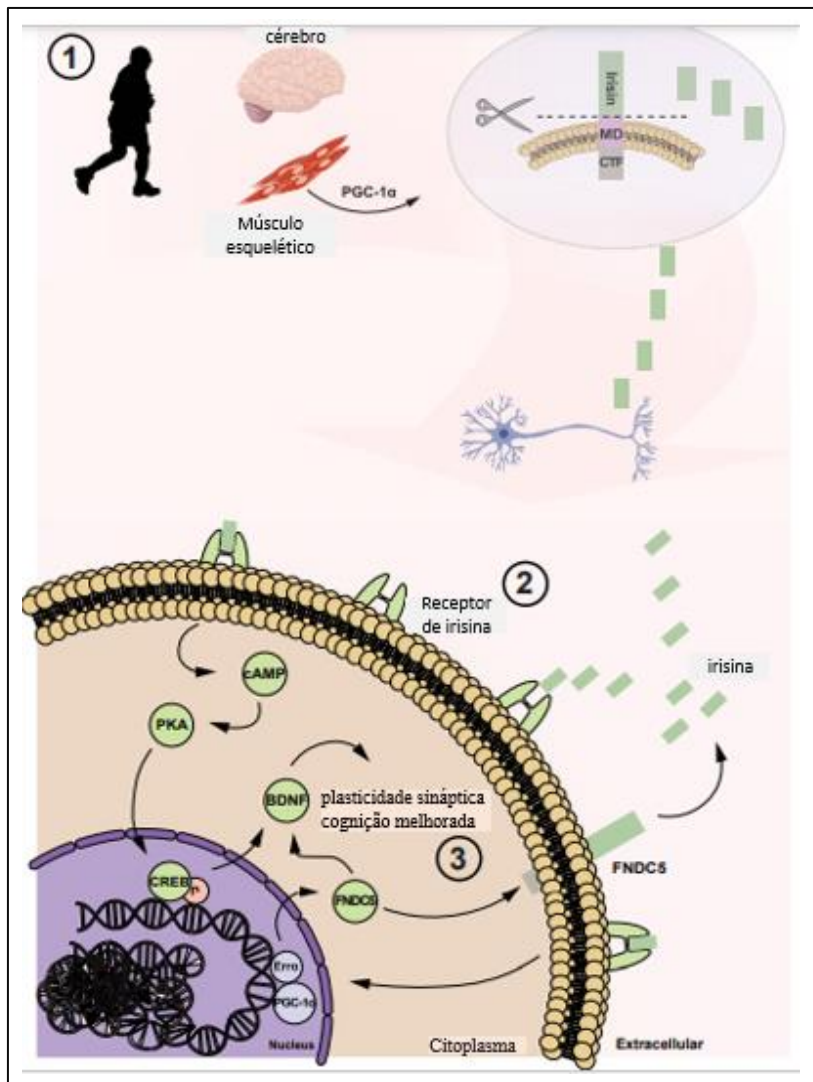
Um estudo feito por Dun e colaboradores (2013) demonstrou que a irisina é expressa em uma população de neurônios centrais. O exercício de alta intensidade eleva a concentração de *FNDC5* no hipocampo e regula a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (WRANN *et al.*, 2013).

O hipocampo é uma importante região do cérebro envolvida na aprendizagem e memória. A presença de BDNF é essencial para a plasticidade, sinapnogênese, diferenciação, migração e sobrevivência das células neurais. Portanto, a expressão de *FNDC5* e liberação da irisina age positivamente sobre a sobrevivência, manutenção e função das células neurais (ZHANG & ZHANG, 2016). Há evidências que a ação da irisina em áreas corticais do cérebro está associada ao estímulo da via cAMP/PKA/CREB (FIGURA 5) (FREITAS *et al.*, 2020)

Segundo Lourenço *et al.* (2019) a irisina encontra-se reduzida no hipocampo, assim como no líquido cefalorraquidiano em pessoas com doença de Alzheimer (DA) e demência de Lewyem em estado avançado. Atualmente não existe tratamento eficaz para a DA e estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de buscar a cura ou profilaxia para neutralizar os mecanismos que levam ao dano neural (KIM & SONG, 2018).

Embora os mecanismos ainda não sejam bem claros, a doença de Alzheimer está intimamente associada com a deposição de peptídeos  $\beta$ -amilóides (LONG & HOLTZMAN, 2019). Segundo Lourenço *et al.*, (2019), quando há exposição hipocampal à oligômeros  $A\beta$ , há diminuição dos níveis de proteína *FNDC5*/irisina e baixa expressão da *PGC1- $\alpha$* . A indução de *FNDC5*/irisina no hipocampo previne e reduz o comprometimento neural causado pelos oligômeros  $A\beta$ .

**Figura 5.** O exercício físico induz a expressão de FNDC5, precursor da irisina. Após proteólise, a irisina interage com os neurônios através de receptores ainda desconhecidos. Induz o acúmulo de adenosina monofosfato cíclico que ativa a proteína quinase dependente de cAMP (PKA) e proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP (CREB), induzindo a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro.



Fonte: FREITAS *et al.*, 2020.

## 2.5 Disfunção metabólica canina

A obesidade é definida como o acúmulo excessivo de tecido adiposo no organismo. É o distúrbio nutricional mais prevalente em animais de companhia, e pode contribuir para o desenvolvimento de doenças, bem como com a diminuição da expectativa de vida (ALONSO *et al.*, 2017). O sobrepeso em cães é um fator de risco para o desenvolvimento de dislipidemias e hipertensão arterial. Além disso, o excesso de peso pode contribuir para o



desenvolvimento de diabetes. Tais fatos estão associados a superalimentação, que ao longo da vida podem levar ao excesso de peso e distúrbios metabólicos (TVARIJONAVICIUTE et al., 2012).

A diabetes mellitus (DM) é uma das doenças metabólicas mais comuns em cães. Embora tenha semelhança com humanos, a classificação da diabetes difere entre animais de grande e pequeno porte. As formas comuns e gerais de DM são conhecidas como DM insulino-dependente (IDDM) Tipo-1 e não-IDDM (NIDDM) Tipo-2 (NIAZ et al., 2018).

Atualmente, a insulinoterapia é a base para o tratamento da diabetes em cães. No mercado veterinário existem três medicamentos disponíveis para uso. O caninsulin (Caninsulin®) à base de insulina suína em suspensão de zinco, o humulin (NPH - Humulin®) à base de insulina recombinante humana e a insulina de origem bovina (SCARABUCCI, 2018). Porém, a mais recomendada para tratamento de diabetes em cães e gatos é a insulina humana produzida com base na tecnologia do DNA recombinante, pois é a que apresenta menor imunogenicidade. A incidência de diabetes em cães chega a um em cada 100 animais, onde as fêmeas apresentam cerca de 70 % dos casos (MESQUITA et al, 2022).

A disfunção cognitiva canina (CCD) afeta cerca de 60% dos cães mais velhos. De modo geral, um cão é considerado idoso/geriátrico após viver cerca de 75% de sua expectativa de vida. Os sinais mais óbvios da síndrome incluem perda de memória, senso de orientação deficiente ou completamente perdido, mudanças no comportamento e confusão (MIHEVEC & MAJDIC, 2019). A fisiopatologia do desenvolvimento da disfunção cognitiva está associada à disfunção mitocondrial, dano oxidativo acumulativo e acúmulo progressivo de beta-amilóide (A $\beta$ ) em placas difusas na vasculatura cerebral (HEAD, 2013).

O hormônio irisina pode ser a subsídio para desenvolvimento de terapias direcionadas à disfunção metabólica canina. Entretanto, estudos precisam ser desenvolvidos. Segundo Bell et al. (2016) em cães *Greyhound* os níveis de irisina aumentam 28% em 10 minutos após exercício físico, e retorna as concentrações basais após duas horas. Isso pode ser em decorrência do mecanismo compensatório para restauração da homeostase do ATP, o que leva a um efeito imediato da irisina, mas de curto prazo, no aumento da sensibilidade à insulina e/ou oxidação de ácidos graxos

## 2.6 Clonagem e expressão gênica

No centro da biologia molecular está o DNA, responsável por armazenar informações que são transcritas para o RNA, e posteriormente traduzidas em proteínas. A expressão gênica começa com a transcrição, que é a síntese de uma molécula de RNA a partir da fita de DNA, com recrutamento da RNA polimerase, processo pelo qual depende de diversas moléculas regulatórias, para então ser traduzidos nos ribossomos em proteínas (VASCONCELOS *et al.*, 2021).

Pelo controle da expressão gênica a nível traducional, a célula consegue ajustar a abundância de proteínas, responder rapidamente a mudanças ambientais e restringir as proteínas sintetizadas a lugares específicos na célula (IWASAKI & INGOLIA, 2016). A tecnologia do DNA recombinante baseia-se na utilização de técnicas das quais podem ser usadas para analisar desde a sequência gênica até o processo final de síntese proteica (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

O conhecimento do dogma central da biologia molecular é a base para compreensão e utilização da tecnologia do DNA recombinante. Uma vez que, a maquinaria celular fundamenta-se em três principais processos para que o gene seja expresso: replicação, transcrição e tradução (VASCONCELOS *et al.*, 2021). As etapas principais para produção de uma proteína recombinante compreendem, sequencialmente:

- Seleção do gene de interesse
- Escolha do sistema de expressão
- Clonagem
- Expressão

As ferramentas utilizadas na engenharia genética permitem manipular sistemas biológicos para sintetizar moléculas úteis como vacinas, hormônios e proteínas de interesse biotecnológico. A biologia sintética usa dessas técnicas para remodelar ou criar novos organismos. É uma linha de pesquisa que busca produzir substâncias que não sejam produzidas naturalmente, ou criar organismos novos a partir de blocos de construção mais simples (NASCIMENTO *et al.*, 2003; ROLREGGER & SGANZERLA & SIMÃO-SILVA, 2020)

## 2.7 Vetor de expressão

Vetores são moléculas utilizadas como veículos no processo de clonagem que levam uma parte do DNA exógeno para dentro da célula hospedeira. Uma variedade de tipos de vetores está disponível (ASTOLFI-FILHO *et al.*, 2005; KHAN, 2009). A partir das técnicas de engenharia genética, plasmídeos de origem natural estão sendo modificados, a fim de criar vetores com características desejadas (WOHLKE, 2012).

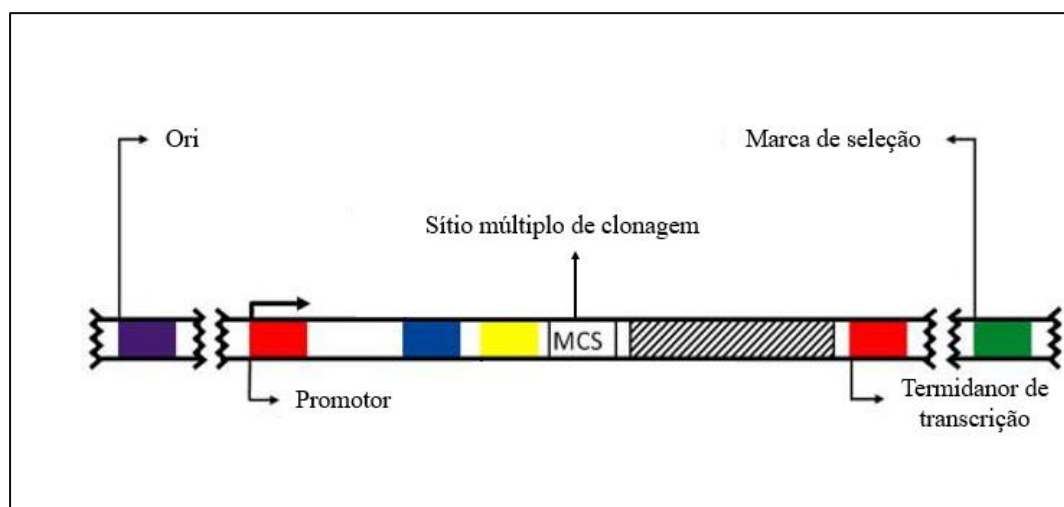
Os plasmídeos são elementos genéticos extracromossomais. Trata-se de uma molécula pequena de DNA circular, presente em bactérias. Geralmente não estão associadas às necessidades essenciais da célula, porém, pode lhe conferir algumas vantagens (WOHLKE, 2012). Os plasmídeos podem conter genes que conferem características benéficas ao seu hospedeiro como resistência a antibióticos, virulência, tolerâncias a metais pesados e catabolismo de fontes únicas de nutrientes (CARROL & WONG, 2018).

Tendo em vista o bom funcionamento, para que seja considerado um vetor competente, o plasmídeo deve obrigatoriamente apresentar algumas características (NASCIMENTO *et al.*, 2003). Ter uma região denominada de (*ori*), que é reconhecida pelos mecanismos de replicação celular. Possuir um gene que codifica um produto que confira uma vantagem seletiva a célula transformada, chamado de marcador de seleção, geralmente utiliza-se genes que permitam que as bactérias sejam resistentes a antibióticos. Apresentar dois ou mais sítios de clivagem para endonucleases, denominado de múltiplos sítios de clonagem, local onde o gene exógeno é ligado ao vetor (NORA *et al.*, 2018).

Para o vetor de expressão, além de todos os elementos acima citados, é necessário que haja a região promotora, local de reconhecimento da RNA polimerase - responsável pela transcrição do gene, que posteriormente será expresso pelo organismo hospedeiro. Além disso, é essencial que haja o terminador de transcrição a jusante da sequência codificante, para evitar a transcrição de RNA mensageiro desnecessário (FIGURA 6) (ROSANO & CECCARELLI, 2014).

Os vetores integrativos se integram no genoma do hospedeiro por recombinação homóloga, o que lhe confere estabilidade, porém, não são auto-replicáveis e geralmente estão presentes em um baixo número de cópias (LEITE, 2008).

**Figura 6.** Esquema demonstrando as principais características de um vetor de expressão. Região *ori*, região promotora, tags de afinidade, múltiplo sítio de clonagem (MCS), marca de seleção e terminador de transcrição.



Fonte: ROSANO & CECCARELLI, 2014.

## 2.8 Hospedeiros bacterianos

Hospedeiro ou organismo-alvo são células ou organismos capazes de receber um DNA exógeno e permitir sua replicação (VEDOVELI & CASTRO, 2016). O DNA recombinante é obtido a partir da clonagem molecular. Processo que permite o isolamento e propagação da sequência gênica. Em condições ideais, o gene de interesse pode ser expresso, possibilitando a síntese de proteínas heterólogas (JONASSON, 2002).

O sistema de expressão adequado depende da proteína a ser produzida. Principalmente das propriedades e do destino final do peptídeo expresso. Se a proteína apresentar várias subunidades e necessitar de alterações pós-traducionais, a hospedeira preferencial é a de origem eucariótica, entretanto, a bactéria *E. coli* tem sido utilizada com sucesso como hospedeira para expressão de proteínas mais simples (JONASSON, 2002; MIYAMOTO, 2013).

A bactéria Gram-negativa *E. coli*, é comumente utilizada como célula hospedeira para expressão heteróloga de proteína, por ter as cepas de expressão bem caracterizadas, usarem meios de cultivo baratos e simples e apresentarem crescimento exponencial rápido (BONEYX, 1999; REDDI, 2002). Sistemas de expressão alternativos são utilizados quando

os produtos finais não são biologicamente funcionais devido à falta de modificações pós-traducionais ou quando a recuperação proteica é muito baixa (JONASSON, 2002).

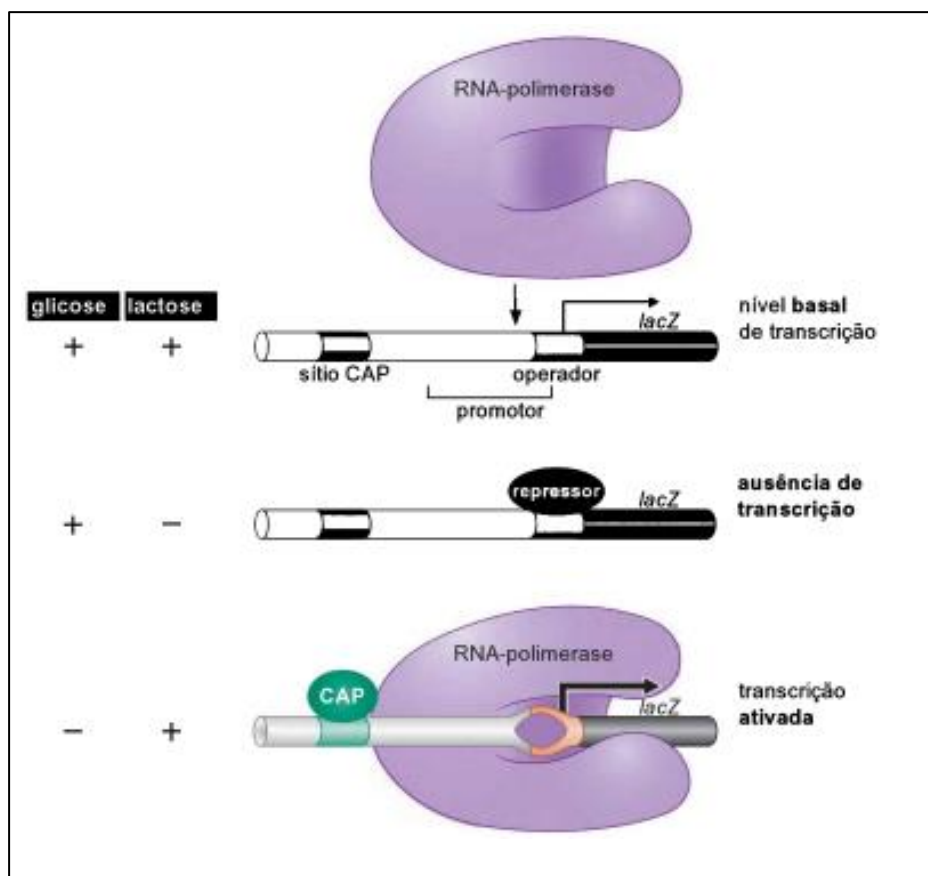
## **2.9 Sistema de expressão heteróloga em *Escherichia coli* baseados no operon *lac***

O modelo do operon em bactérias foi postulado a partir da década de 60, quando os cientistas Jacob & Monod (1961) propuseram que a expressão gênica seria regulada por proteínas reguladoras que se ligavam ao promotor e impediam ou ativavam o início da transcrição pela RNA polimerase.

Os genes bacterianos estão frequentemente organizados em operons, e a organização desses genes permite que, quando ativados, sejam expressos simultaneamente. O promotor é o local onde a RNA polimerase se ancora para iniciar a transcrição, e todos os genes estruturais de um operon estão à jusante de um promotor, desta forma, serão transcritos em um único RNA mensageiro, porém são posteriormente traduzidos em proteínas individuais. Os exemplos de operons mais bem descritos são da bactéria *E. coli*. O operon *lac* por exemplo, envolve enzimas relacionadas com o metabolismo da glicose (RALSTON, 2008).

Os sistemas de expressão mais utilizados em bactérias são baseados na regulação do operon *lac* presente em células de *E.coli*, que codifica três produtos gênicos LacZ, LacY e LacA (ULLMANN, 2009; MARBACH E BETTENBROCK, 2012). LacY é uma permease que atua no transporte da lactose para dentro da célula. A lactose é clivada em glicose e galactose pela enzima  $\beta$ -galactosidase, produto da expressão do *lacZ*. LacA é uma transacetilase e está associada a desintoxicação celular, pela exportação de açúcares tóxicos que não podem ser metabolizados pela célula. A expressão desses genes é regulada diretamente por dois sinais ambientais, positivamente pela lactose e negativamente pela glicose, ou seja, na presença de lactose há expressão desde genes, uma vez que, estão associados ao seu metabolismo (FIGURA 7) (PINTO & MIRANDA & SOUSA, 2021).

**Figura 7.** Representação esquemática da regulação operon lac. RNA polimerase reconhecendo a região promotora, na presença de glicose e lactose, há um nível basal de transcrição. Repressor ancorado ao operador, na presença de glicose e ausência de lactose, há ausência de transcrição. Na presença de alolactose o repressor é liberado da região operadora, permitindo que a RNA se ligue ao promotor e ocorra a transcrição.



Fonte: WATSON et al., 2015.

Na ausência de alolactose, o repressor lacI liga-se a sítios de ligação do operador impedindo a ligação da RNA polimerase ao sítio promotor, aumentando a repressão da expressão gênica (KELLY *et al.*, 2019). Quando há alolactose (um derivado da lactose) ou indutores artificiais, o repressor lacI é liberado do DNA, fazendo com que haja transcrição, além disso, um complexo regulador global da proteína receptora de cAMP-cAMP (cAMP-CRP) liga-se ao lac promotor do operon, recrutando a RNA polimerase promovendo a transcrição, em contrapartida, na presença de glicose há diminuição do cAMP diminuindo a disponibilidade para formação do complexo cAMP-CRP e consequentemente a transcrição (FIGURA 7) (PHILLIPS *et al.*, 2019; BELLIVEAU *et al.*, 2018).

### 3 JUSTIFICATIVA

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) demonstram que os brasileiros têm mais animais de estimação do que crianças em seus lares. E cada vez mais são considerados como membros da família. A pesquisa constatou ainda que os cães são o animal mais popular do Brasil, deixando os felinos em segundo lugar.

Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET), o Brasil tem a segunda maior população canina do mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. O mercado pet brasileiro é um dos mais vibrantes entre os países, ocupando a sexta posição em termos de faturamento. Durante a pandemia, obteve uma impressionante alta de 42,4 %. Os dados do Instituto Pet Brasil (IPB) mostram que o mercado teve um faturamento de 51,7 bilhões no ano de 2021. Sendo 5,8 bilhões decorrente da venda de medicamentos veterinários.

Estudos mostram que 60 % dos cães mais idosos apresentam disfunção cognitiva e 1 em cada 100 desenvolve diabetes mellitus ao longo da vida. A proteína irisina tem demonstrado potencial aplicação para o tratamento de morbidades e distúrbios metabólicos. Nesse sentido, esse trabalho propõe a utilização da tecnologia do DNA recombinante para produção de irisina canina, tendo como sistema de expressão a bactéria *Escherichia coli*. A fim de dar subsídios para desenvolvimento de futuras terapias de disfunções metabólicas, e de doenças neurodegenerativas em cães.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Expressar a sequência codificadora de irisina canina em células de *Escherichia coli*.

### **4.2 Objetivos específicos**

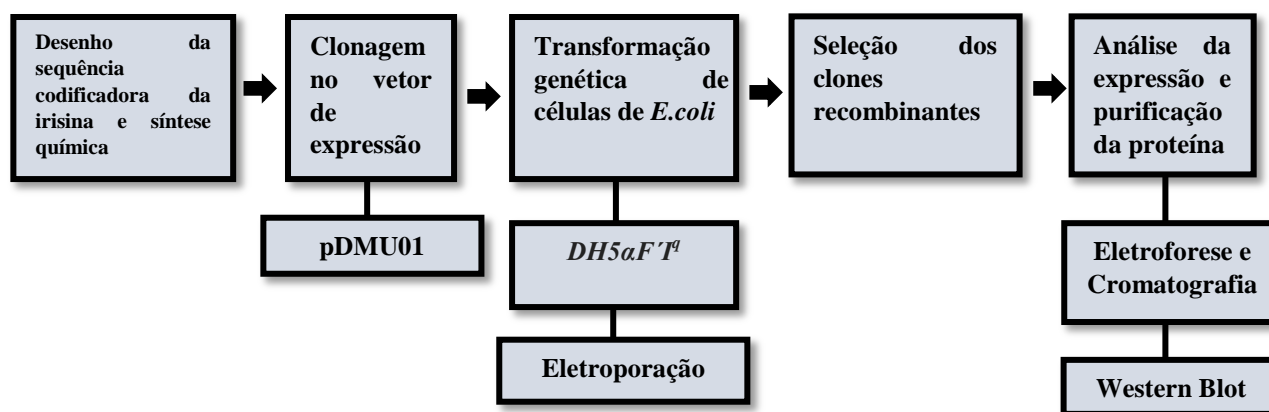
- Desenhar a sequência gênica da irisina e obter o gene sintético;
- Clonar e expressar o gene da irisina no vetor pDMU01;
- Analisar a expressão do gene da irisina em *E. coli* sob o controle do promotor DM;
- Purificar a irisina recombinante.



## 5. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologias de DNA do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas.

### 5.1 Desenho experimental



### 5.2 Material

#### 5.2.1 Linhagens de *E. coli* utilizadas.

A linhagem de célula usada neste trabalho foi a *E. coli* *DH5αF' Iq*, a qual faz parte do acervo de células hospedeiras do Centro de Apoio Multidisciplinar – Laboratório de Tecnologia do DNA Recombinante da Universidade Federal do Amazonas. É conservada por criopreservação a uma temperatura de -80 °C na presença de glicerol (TABELA 1).

**Tabela 1.** Linhagem e genótipo da célula *E. coli* utilizada no presente estudo

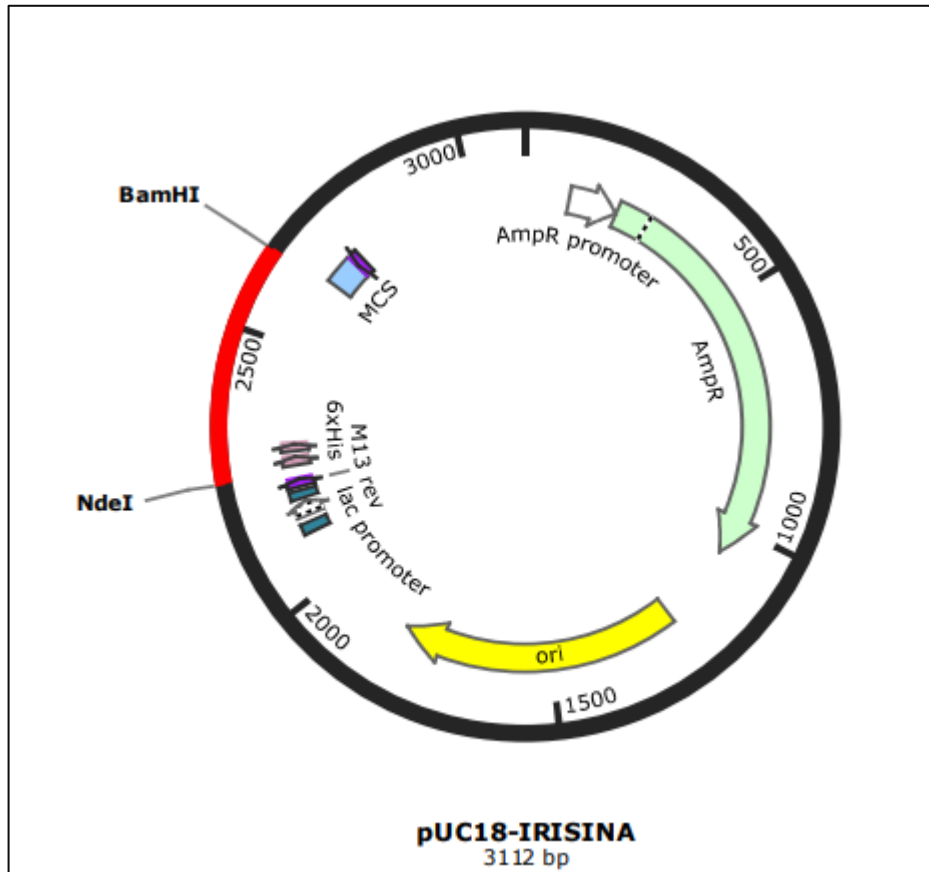
Bactéria	Bactéria	Genótipo	Utilização
<i>Escherichia coli</i>	<i>DH5αF' Iq</i>	F-φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1/F' proAB+ lacIqZΔM15 zff::Tn5 [KmR].	Clonagem e expressão

## 5.2.2 Vetores

### Vetor de clonagem pUC18-IRISINA

Vetor de clonagem contendo a sequência gênica da irisina construído pela empresa FastBio (FIGURA 8).

**Figura 8.** Mapa físico do plasmídeo pUC18 contendo o gene da irisina.

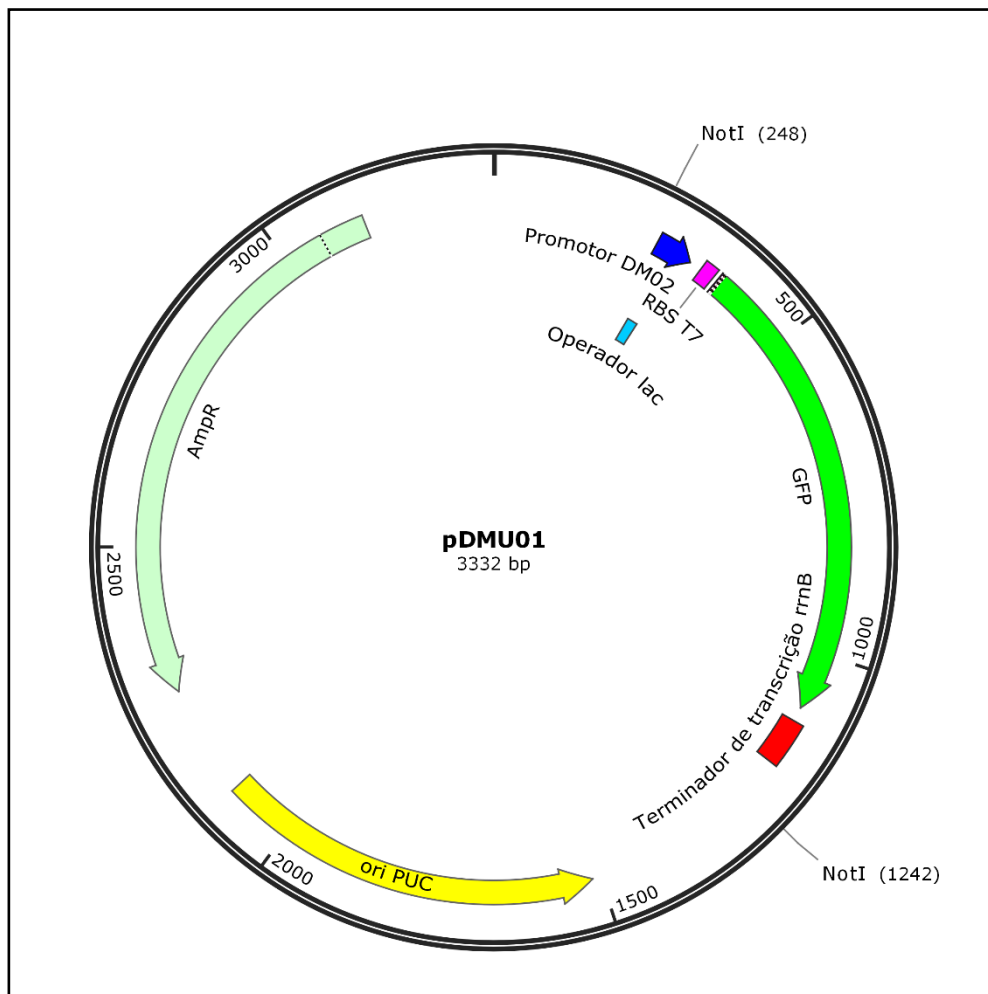


### Vetor de clonagem e expressão pDMU01

O vetor de clonagem e expressão pDMU01 constituído de 3332 pares de bases possui um cassete de expressão composto por um promotor sintético (DM01) regulado pelo sistema *lac*, sítio de ligação ao ribossomo do fago T7, terminador de transcrição e um gene repórter GFP (*Green Fluorescent Protein*). Contém um marcador de seleção para ampicilina e possui alto número de replicação no hospedeiro (500~700 cópias) (FIGURA 9).

Vetor construído no Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Este vetor possui o gene de aproximadamente 720pb codificador da proteína GFP de aproximadamente 27kDa foi retirado através de tratamento com enzimas de restrição, *BamHI* e *NdeI* e que posteriormente foi utilizado para a clonagem do gene da irisina.

**Figura 9.** Mapa físico do plasmídeo pDMU01 contendo o gene da proteína GFP.



### 5.2.3 Meios de cultura

Os meios utilizados para crescimento e cultivo das células são o Luria Bertani (LB) líquido e/ou sólido e sua composição está apresentada na tabela 2.

**Tabela 2.** Meios de cultura utilizados e suas respectivas composições.

Meio	Composição	
LB Líquido (Luria Bertani)	Triptona	10g/L
	Extrato de levedura	5g/L
	NaCl	5g/L
	pH	7,5
	Para tornar o meio sólido adiciona-se 15g/L de Ágar	

### 5.2.4 Enzimas

As enzimas de restrição, assim como outras enzimas modificadoras de DNA que foram usadas no presente trabalho estão apresentadas na tabela (TABELA 3).

**Tabela 3.** Enzimas de restrição utilizadas neste trabalho.

Enzima	Tampão	Temperatura de incubação	Procedência
<i>Bam</i> HI	NEBuffer 3	37°C	New EnglandBioLabs <sup>®</sup> <i>inc</i>
<i>Nde</i> I	NEBuffer 4	37°C	New EnglandBioLabs <sup>®</sup> <i>inc</i>
<i>T4 DNA ligase</i>	Da própria enzima	37°C ou 16°C	New EnglandBioLabs <sup>®</sup> <i>inc</i>

### 5.2.5 Reagentes e outros materiais

O marcador molecular foi utilizado para a identificação da massa molecular dos fragmentos de DNA corados pelo brometo de etídeo. O kit para purificação de DNA foi adquirido da Cellco. O marcador de proteína (Invitrogen) foi usado nas corridas eletroforéticas. Todos os demais reagentes usados foram de grau analítico.

## 5.3 Métodos

### 5.3.1 Estudo da sequência de aminoácidos da proteína

A busca da sequência gênica da irisina canina foi feita por prospecção *in silico* nas bases de dados GenBank e UniProt. Para o alinhamento das sequências utilizou-se a ferramenta BLAST da plataforma National Center for Biotechnology Information (NCBI).

### 5.3.2 Design da sequência gênica

A sequência gênica para clonagem e expressão da irisina contendo 432pb foi desenhada para conter os seguintes elementos: sítio de enzimas de restrição *EcoRI* e *NdeI*, três aminoácidos espaçadores, cauda de histidina, quatro aminoácidos espaçadores, sítio de enterocinase, sequência da irisina e sítios de enzima de restrição *BamHI* e *NotI*. A sequência da irisina canina foi desenhada e otimizada para códons preferenciais de *Escherichia coli*.

### 5.3.3 Modelagem molecular

Os dados publicados demonstram que a irisina circulante é encontrada como um homodímero. Para a predição tridimensional computacional da proteína, foi utilizado o software Alpha Fold-colab(<https://abrir.link/yxwo8>). O programa prevê estruturas 3D de proteínas a partir da estrutura primária do peptídeo.

### 5.3.4 Isolamento da sequência da irisina

Para a construção do vetor de clonagem e expressão pTI01, foi necessário isolar a sequência da irisina clonada no vetor comercial pUC18. Para então ser clonada no vetor pDMU01. O isolamento da sequência foi realizado por meio de digestão enzimática do vetor pUC18-IRISINA, utilizando as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*. O vetor pDMU01 também foi digerido com as mesmas enzimas para retirada do gene que codifica a proteína GFP.

As amostras foram analisadas em gel de agarose e posterior à separação de bandas, os fragmentos correspondentes ao vetor pDMU01 e a irisina foram purificados utilizando kit de purificação.

### 5.3.5 Ligação do gene da irisina ao vetor pDMU01

Após a digestão do vetor pUC18 para isolamento da sequência gênica da irisina e do pDMU01 para remoção do gene da GFP pelas enzimas *NdeI* e *BamHI*, e posterior purificação dos fragmentos, segue o processo de ligação inserto/vetor.

A ligação do gene da irisina ao vetor pDMU01 foi realizada obedecendo a razão molar 3:1, ou seja, 3 de inserto e 1 de vetor.

Foi usada a enzima T4 DNA ligase (0,5 µL) o tampão de ligase Tp10x contendo ATP (1,6 µL), 4 µL de H<sub>2</sub>O, 6 µL de vetor e 8 µL de inserto, resultando de um volume final de 25 µL de reação, e incubada *overnight* (16 h) em 16 °C.

Posteriormente, o produto da ligação foi submetido a uma precipitação com o objetivo de purificar o material, para então ser inserido em célula de *E. coli* pela técnica de eletroporação.

Para a precipitação foram adicionados 2 µL de glicogênio no volume total da ligação, 1/10v de NaCl 3M e 2,5v de etanol. E incubado por 2 h a uma temperatura de -80 °C. O material foi centrifugado por 15 min 4°C/16.000 xg. O sobrenadante foi retirado, e adicionado 1 mL de álcool 70% (-20°C). A amostra foi centrifugada por 10 min 4°C/16.000 xg. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi submetido ao processo de secagem. O material foi reidratado com 3 µL de água ultrapura.

### 5.3.6 Transformação genética de *E. coli Dh5αF'Iq* por eletroporação

Uma alíquota de 1,5 µL do sistema de ligação, após precipitação e redissolução em 3,0 µL de H<sub>2</sub>O estéril, foi usada para transformar 80 µL de célula eletrocompetente *DH5αF'Iq*. Após adicionar o DNA ligado à célula competente, submeteu-se à eletroporação, usando a voltagem de 1900 volts em cubeta de 1 mm.

O material foi ressuspenso em 600 µL de meio LB e transferido para um microtubo de 1,5 mL, que foi em seguida incubado por 1 hora a 37 °C sob agitação lenta. Seguido de plaqueamento em meio seletivo contendo o antibiótico ampicilina a 100 µg/mL.

A clonagem do gene no vetor pDMU01 foi confirmada por análise de restrição dos plasmídeos extraídos dos clones transformantes, usando as enzimas *NdeI* e *BamHI* e

visualização dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O vetor obtido foi denominado por pTI01.

### **5.3.7 Indução da expressão do gene de irisina canina**

Uma colônia dos clones obtidos em 5.3.6 foi pré-inoculada em 5 mL de meio LB contendo glicose 1% e antibiótico ampicilina 100 ug/mL , seguido de incubação *overnight* a 37 °C sob rotação de 150 rpm.

Uma alíquota de 1 mL foi inoculada em 50 mL de meio LB contendo 100 ug/ml antibiótico ampicilina, em erlenmeyer de 250 mL. A cultura foi mantida a uma temperatura de 37 °C sob rotação de 150 rpm até chegar a densidade óptica OD<sub>600nm</sub> 0,5. No momento em que a cultura atingiu essa densidade celular, foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mM, e a cultura foi novamente incubada por 10 h com o objetivo de induzir a expressão do gene heterólogo. Paralelamente foi mantida uma cultura nas mesmas condições, porém sem a indução por IPTG e com adição de glicose 1 %.

### **5.3.8 Análise do produto expresso por SDS-PAGE**

A expressão do gene que codifica a proteína heteróloga foi verificada e comparada com o controle negativo por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

A coleta de células para extração de proteína foi realizada por centrifugação de 1 mL da cultura induzida e do controle negativo a 12.000 g por 3 min em temperatura ambiente. As amostras foram ressuspensas com 250 µL de tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8 100 mM, SDS 2%, B-mercaptaetanol 2%, glicerol 10 %), transferidas para o gelo e submetidas ao processo de ruptura ultrassônica seguindo 3 ciclos de 30 s com intervalos de tempo similares, na potência de 80 watts utilizando-se o equipamento sonicador de ponteira ultrassônico gabinete acústico 800 watts Eco-Sonics.

Foram separados 40 µL de cada amostra e adicionado 0,2% de tampão de amostra com bromofenol, e submetido ao processo de fervura em banho-maria por 5 min. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida 12%, posteriormente foram reveladas com a solução corante (Ácido acético 10%, Comassie Dye 0,1%, etanol 40%, água ultrapura) e

lavados em solução descorante (Etanol 50%, ácido acético 10%, água ultrapura) até o desaparecimento da coloração do fundo e visualização das bandas.

### **5.3.9 Obtenção dos extratos de proteínas solúveis e insolúveis e análise por SDS-PAGE**

A extração da proteína foi realizada após coleta de células de 1 mL de cultura por centrifugação a 12.000 g por 3 min à temperatura ambiente, da cultura induzida e do controle negativo. As amostras foram ressuspensas com 250 µL de tampão TE (Tris-HCl pH 7,5 20 mM, EDTA 5 mM), adicionado 6,25 µL de lisozima 20 mg/mL (Concentração final de 0,5 mg/mL) e incubado por 10 min a 37 °C.

Em seguida, foram transferidas para o gelo e submetidas ao processo de ruptura ultrassônica seguindo 3 ciclos de 20s com intervalos de tempo similares, na potência de 80 watts utilizando-se o equipamento sonicador de ponteira ultrassônico gabinete acústico 800 watts Eco-Sonics. Foram adicionados 2,5 µL de triton X-100 10% (Concentração final de 0,1%) e homogeneizado lentamente.

As amostras foram centrifugadas por 10 min/ 12.000 g/ 4 °C e separadas as frações solúveis e insolúveis. O sobrenadante (Fração solúvel) foi transferido para microtubo de 1,5 mL e o precipitado (Fração insolúvel) foi ressuspensado com 250 µL de tampão TE (Tris-HCl pH 7,5 20mM, EDTA 5mM) e adicionado 2,5 µL de triton X-100 10% (Concentração final de 0,1%).

Foram separados 30µL de cada amostra e adicionado 30µL do tampão de amostra 5x nas concentrações finais de (Tris-HCl pH 6,8 100mM, SDS 2%, B-mercaptaetanol 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,2%) e submetido ao processo de fervura em banho-maria por 5 min. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida 12%, posteriormente foram reveladas com a solução corante (Ácido acético 10%, Comassie Dye 0,1% , etanol 40%, água ultrapura) e lavados em solução descorante (Etanol 50%, ácido acético 10%, água ultrapura) até o desaparecimento da coloração do fundo e visualização das bandas.

### **5.3.10 Purificação da proteína por cromatografia de afinidade**

Para extração e purificação da proteína foi feita uma nova indução. Onde, uma colônia dos clones obtidos na clonagem molecular foi pré-inoculada em 5 mL de meio LB contendo



glicose 1% e antibiótico ampicilina 100 ng/mL, seguido de incubação overnight a 37 °C sob rotação de 150 rpm. Uma alíquota de 1 mL foi inoculada em 50 mL de meio LB contendo 100 ug/ml antibiótico ampicilina, em erlenmeyer de 500 mL. A cultura foi mantida a uma temperatura de 30 °C sob rotação de 150 rpm até chegar a densidade óptica (Abs600nm) de 0,6. No momento em que a cultura atingiu essa densidade celular, foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mM, e a cultura foi novamente incubada por 10 h com o objetivo de induzir a expressão do gene heterólogo. A coleta de células para extração e purificação da proteína foi realizada por centrifugação de 50 mL da cultura induzida a 12.000 xg por 3 min a 4 °C.

A técnica foi baseada no método de Porath e colaboradores (1975). O precipitado de 50ml de cultura foi ressuscitado em 5ml de tampão A (20 mM de Tris-HCl Ph 8, 500 mM de NaCl, 5 mM de imidazol, água milli-Q). Para lise celular, o material ressuscitado foi submetido ao processo de sonicação seguindo 3 ciclos de 30s, e em seguida foi centrifugado por 40 min /12000xg /4°C com o objetivo de separar as frações solúveis e insolúveis. A fração solúvel presente no sobrenadante foi filtrada em membrana PES. 0,45µm, aplicada na coluna HisTrap HP 5 mL e, posteriormente coletadas e analisadas em gel SDS-PAGE.

### **5.3.11 Western Blotting**

A análise por Western Blotting foi realizada segundo método descrito por Towbin (1979). Inicialmente a placa de cerâmica do equipamento (INVITROGEN-semidry) foi umedecida com tampão de transferência 1 x (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 10%). Após a corrida em gel SDS-PAGE, os papéis filtros, a membrana e o gel foram incubados por 2 min em tampão de transferência 1 x (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 10%). Foi feita a montagem do sanduíche de transferência e o mesmo permaneceu umedecido em tampão de transferência 1 x (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 10%).

A transferência foi realizada utilizando voltagem 20 V, 700 mA, 150 W por 90 minutos. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1 hora em solução bloqueadora (PBS + leite desnatado 5%) e incubada por 1 h em agitação lenta com o anticorpo primário monoclonal 6x-His Tag - Invitrogen que estava diluído 1:1000 em solução PBS NaCl 1,37 M, KCl 27 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM , KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18 mM; Tween 0,05%; leite desnatado 5%).

Após esse tempo, a membrana foi lavada 3 vezes com solução de lavagem (PBS NaCl 1,37 M, KCl 27 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100mM , KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18 mM e Tween 0,05%) por 5 min cada lavagem.

A membrana foi então incubada por 30 min sob agitação à temperatura ambiente com o anticorpo secundário (Anti-Mouse IgG – conjugado a peroxidase – SIGMA com diluição 1:1000). E novamente submetida ao processo de lavagem por 3 vezes em solução (PBS NaCl 1,37 M, KCl 27 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100mM , KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18 mM e Tween 0,05%) por 5 min cada lavagem.

A revelação foi procedida utilizando a solução reveladora (PBS NaCl 1,37 M, KCl 27 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100mM , KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18 mM; 3,3'-diaminobenzidine 5 mg; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 µL), no qual foi pipetada 1 mL de solução (por 5 vezes) em cima da membrana e incubada por 5 min. Para parar a reação, adicionou-se água deionizada.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Estudo da sequência de aminoácidos da proteína

A busca e alinhamento da sequência gênica a ser clonada realizada nas plataformas NCBI e UniProt originaram 346 sequências. Dessas, foram selecionadas seis sequências que são oriundas das espécies *Homo sapiens* e *Canis lupus familiaris* (TABELA 4). O alinhamento demonstrou que há similaridade da sequência que codifica a irisina entre as espécies *Homo sapiens* e *Canis lupus familiaris*.

**Tabela 4.** Sequencias que codificam FNDC5/IRISINA

Origem	Sequência
<i>Canis lupus familiaris</i> NCBI – Isofor: X1	<b>M</b> YSPSAPVNVTVRHLKANSVVSWDVLEDE <b>VVIGFAISQKKDVRMLRFIQEVNTTTRSC</b> <b>ALWDLEEDTEYIVHVQAISIQQSPASEPVLFKTPREAEKMASKNKDEVTMKE</b> MAGSQQ RTGEVLIIVVFLFMWAGVIALFCRQYDIIKDNEPNNNKEKTKSASENSTPEHQGGGLLRSKFPN KPSVNIIEA
<i>Canis lupus familiaris</i> NCBI – Isofor: X2	WYSPSAPVNVTVRHLKANSVVSWDVLEDEVVIGFAISQKKDVRMLRFIQEVNTTTRSC ALWDLEEDTEYIVHVQAISIQQSPASEPVLFKTPREAEKMASKNKDEVTMKEMAGSQQ RTGEVLIIVVFLFMWAGVIALFCRQYDIIKDNEPNNNKEKTKSASENSTPEHQGGGLLRSKI
<i>Canis lupus familiaris</i> NCBI – Isofor: X3	MHPGPPRAALRLWLGVCVCLALVQADSPSAPVNVTVRHLKANSVVSWDVLEDEVVIGFAIS QKKDVRMLRFIQEVNTTTRSCALWDLEECTEYIVHVQAISIQQSPASEPVLFKTPREA EKMASKNKDEVTMKEMAGSQQRLTGEVLIIVVFLFMWAGVIALFCRQYDIIKDNEPNNNKE KTKSASENSTPEHQGGGLLRSKFPNKPSVNIIEA
<i>Homo sapiens</i> Uniprot – Isofor: X1	MHPGSPSAWPPRARAALRLWLGVCVFALVQADSPSAPVNVTVRHLKANSVVSWDVLEDE VVIGFAISQKKDVRMLRFIQEVNTTTRSCALWDLEEDTEYIVHVQAISIQQSPASEPVL FKTPREAEKMASKNKDEVTMKEMGRNQQLRTGEVLIIVVFLFMWAGVIALFCRQYDIIKD EPNNNKEKTKSASETSTPEHQGGGLLRSKI
<i>Homo sapiens</i> Uniprot – Isofor: X2	MHPGSPSAWPPRARAALRLWLGVCVFALVQADSPSAPVNVTVRHLKANSVVSWDVLEDE VVIGFAISQKKDVRMLRFIQEVNTTTRSCALWDLEEDTEYIVHVQAISIQQSPASEPVL FKTPREAEKMASKNKDEVTMKEMGRNQQLRTGEVLIIVVFLFMWAGVIALFCRQYDIIIE
<i>Homo sapiens</i> Uniprot – NCBI – Isofor: X2	MHPGSPSAWPPRARAALRLWLGVCVFALVQADSPSAPVNVTVRHLKANSVVSWDVLEDE VVIGFAISQKKDVRMLRFIQEVNTTTRSCALWDLEEDTEYIVHVQAISIQQSPASEPVL FKTPREAEKMASKNDEVTMKEMGRNQQLRTGEVLIIVVFLFMWAGVIALFCRQYDIIKDNE PNNNKEKTKSASETSTPEHQGGGLLRSKI

Em uma isoforma, a sequência de aminoácido que codifica a irisina entre cães e humanos é idêntica. A sequência selecionada para dar continuidade ao trabalho (grifada em vermelho) foi a encontrada apenas em cães, ainda assim, difere da encontrada em humanos apenas em um único aminoácido, o primeiro da sequência.

## 6.2 Sequência gênica para clonagem e expressão

A sequência do gene de irisina sintético é mostrada na figura 10, contendo os seguintes elementos: sítio de enzimas de restrição *EcoRI* e *NdeI*, três aminoácidos espaçadores, cauda de histidina, quatro aminoácidos espaçadores, sítio de enteroquinase, sequência da irisina e sítios de enzima de restrição *BamHI* e *NotI*. As endonucleases de restrição reconhecem e cortam sequências específicas de DNA de fita dupla. Dessa forma, os sítios das enzimas de restrição permitem que o DNA seja cortado e clonado à uma outra sequência (BUCKHOUT-WHITE *et al.*, 2018).

**Figura 10.** Desenho da sequência gênica para clonagem e expressão

```
GATGAATTCCATATGAGCGCAGGCCATCACCATCACCATCACACTAGCGGCG
CCGATGACGATGACAAA GATAGCCCCGAGCGCGCCGGTGAATGTGACCGTGCGT
CATCTGAAAGCGAACAGCGCGGTGGTGAGCTGGGATGTGCTGGAAGATGAAGTG
GTGATTGGCTTTGCGATTAGCCAACAAAAAAGATGTGCGTATGCTGCGTTTTTA
TTCAAGAAGTGAACACCACCACCCGTAGCTGCGCGCTGTGGGATCTGGAAGAAG
ATACCGAATATATTGTGCATGTGCAAGCGATTAGCATTCAAGGCCAAAGCCCGGC
GAGCGAACCGGTGCTGTTTAAAACCCCGCGTGAAGCGGAAAAAATGGCGAGCAA
AAACAAAGATGAAGTGACCATGAAAGAATAAGGATCCGCGGCCGCTGAATTC
GCG
```

*EcoRI* + *NdeI* + 3 AMINOÁCIDOS + His-tag (CAUDA DE HISTIDINA) + 4 AMINOÁCIDOS + SÍTIO DA ENTEROQUINASE + SEQUÊNCIA DA IRISINA + *BamHI* + *NotI*

A cauda de histidina é um dos marcadores de purificação mais usados na biotecnologia. É um peptídeo contendo resíduos de histidina (His-tag) fusionados à porção C ou N terminal da proteína recombinante. O aminoácido histidina tem afinidade por íons metálicos. Dessa forma, o uso da His-tag permite que a proteína seja purificada por cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC) (BORNHORST & FALKE, 2010; MIRALLES *et al.*, 2011).

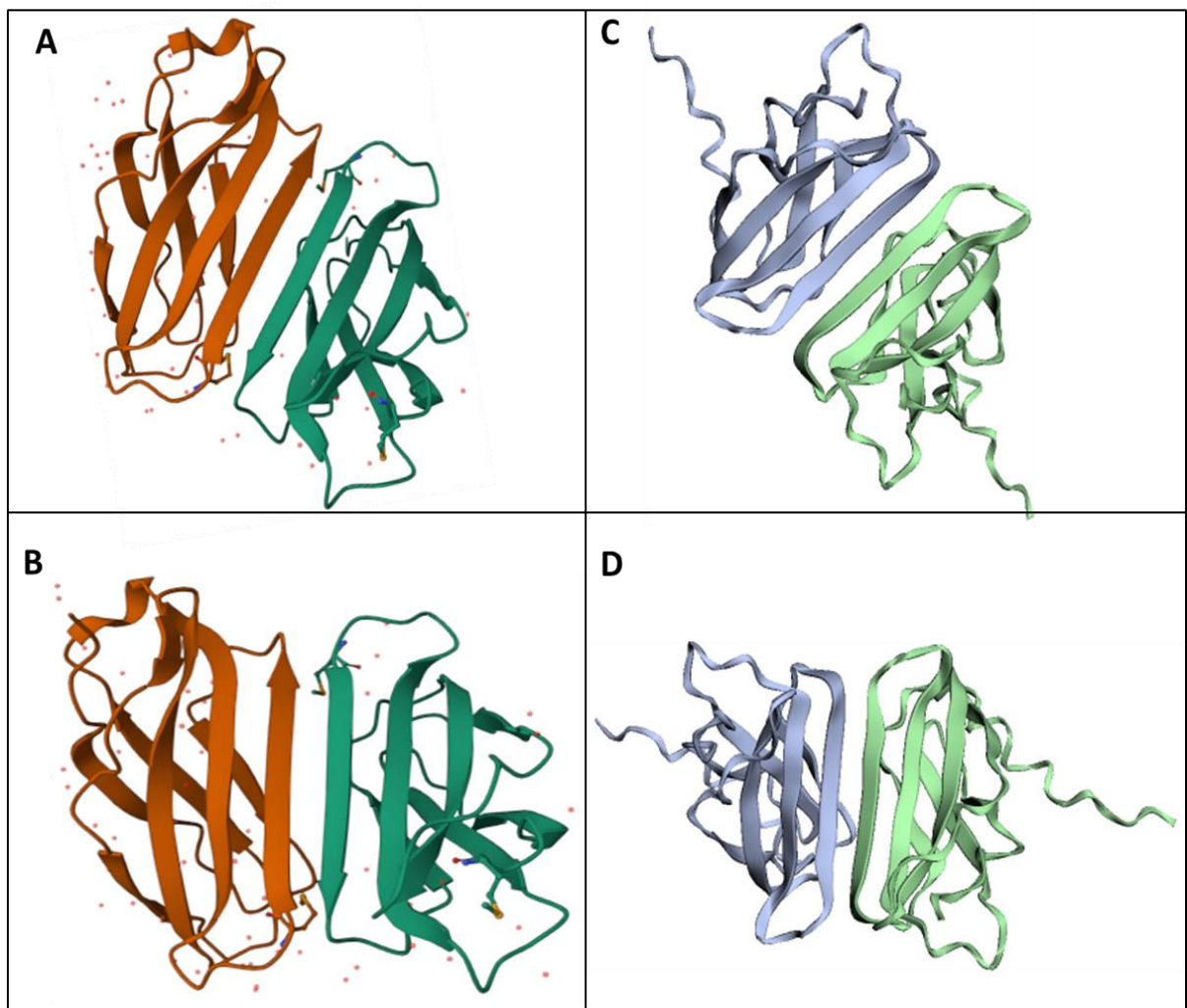
A his-tag é vantajosa para a purificação da proteína, entretanto pode influenciar em experimentos posteriores. Por exemplo, quando há ensaio clínico para avaliar a funcionalidade da proteína heteróloga. A adição de sítio de enteroquinase entre a his-tag e a

sequência gênica da proteína heteróloga permite que a cauda seja removida após a purificação do produto (SHAHRAVAN *et al.*, 2008). Além disso, a adição de aminoácidos espaçadores permite que as sequências não fiquem sobrepostas e interfira nas interações moleculares.

### 6.3 Modelagem molecular

O resultado da modelagem molecular *in silico* está demonstrado na figura 11 (C e D). A imagem 11 (A e B) é oriunda do banco de dados PDB, que mostra a estrutura da proteína definida por difração de raios-X. A modelagem da estrutura prevê que a proteína heteróloga irisina pode tender a formar dímeros.

**Figura 11.** (A e B) Imagem da estrutura cristalográfica da irisina. (C e D) Imagem da modelagem *in silico* da proteína heteróloga irisina

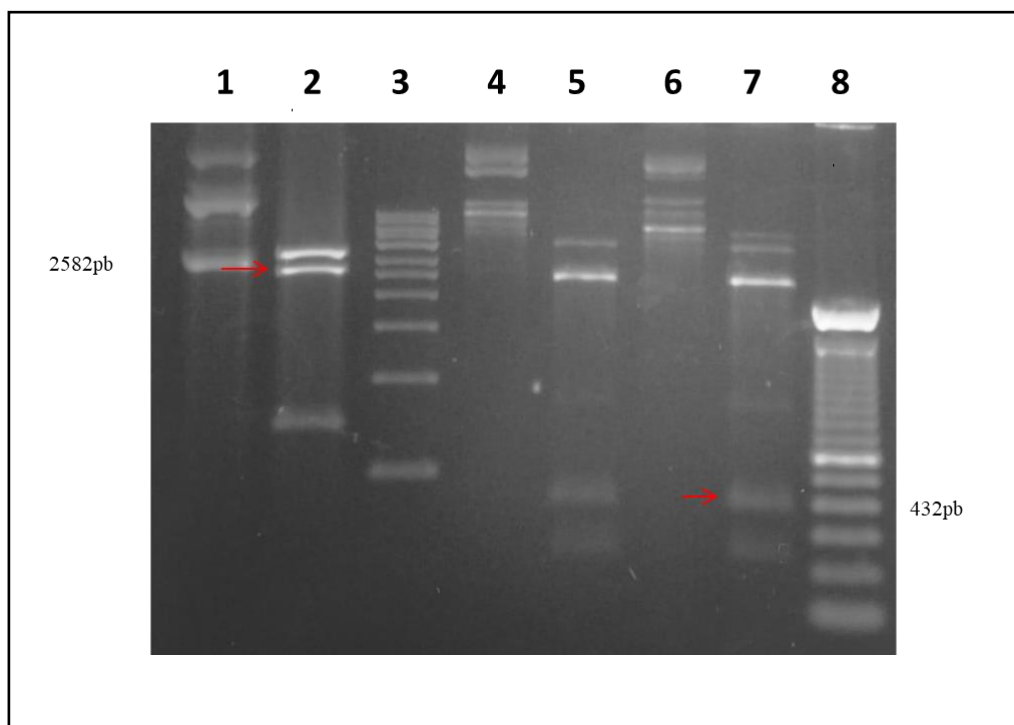


Assim como nos resultados apresentados por Schumacher e colaboradores (2013), a estrutura molecular modelada *in silico* demonstra a subunidade da irisina como uma estrutura formada por folha  $\beta$ . E a formação do dímero se dá pela interação entre essas folhas. A estrutura quaternária da proteína é importante para que esta esteja em sua forma ativa.

#### 6.4 Isolamento do gene de irisina sintético e do arcabouço do vetor pDMU01 por restrição enzimática e purificação das regiões

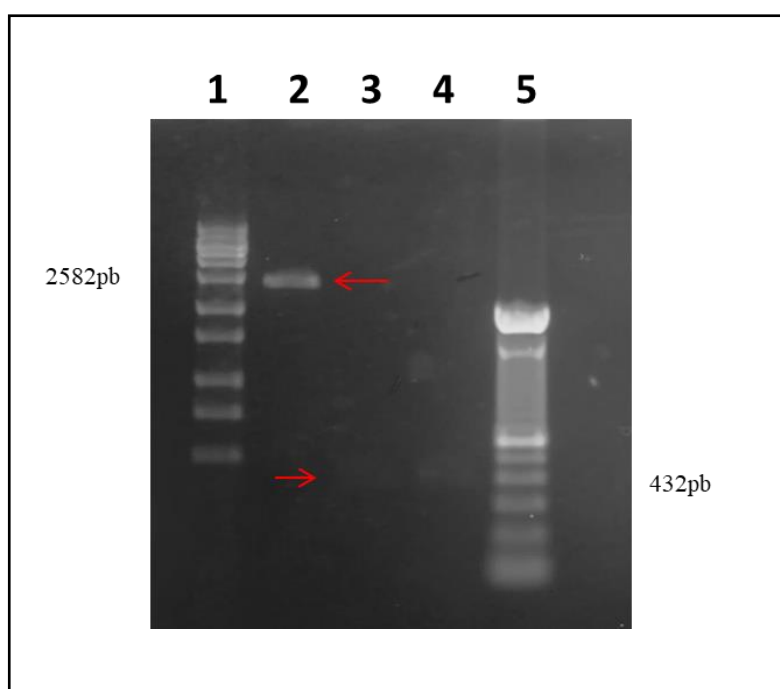
Após o tratamento dos plasmídeos com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* observou-se a liberação dos fragmentos de 2.582pb correspondente ao arcabouço do vetor pDMU01 e de 432pb correspondente ao gene que codifica a proteína irisina (FIGURA 12).

**Figura 12.** Perfil eletroforético do produto de digestão- vetor pDMU01 e pUC18-IRISINA. A coluna 1 demonstra o plasmídeo pDMU01 intacto (controle); a coluna 2 contém o plasmídeo pDMU01 digerido com as enzimas *NdeI* e *BamHI* e liberação do fragmento de 2558pb correspondente ao arcabouço do vetor pDMU01 indicado pela seta vermelha; 3 – marcador molecular; 4 e 6 – pUC18 intacto (controle); 5 e 7 – pUC18 digerido com as enzimas *NdeI* e *BamHI* e liberação do fragmento de 432pb correspondente ao gene que codifica a proteína irisina indicado pela seta vermelha.



Conforme descrito no material e métodos, o plasmídeo pDMU01 foi purificado sem o gene que codifica a GFP, assim como o gene que codifica a irisina, seguindo as instruções do fabricante do kit de purificação GE ilustra (FIGURA 13) (Material e métodos).

**Figura 13.** Perfil eletroforético do produto da purificação do vetor de clonagem e expressão pDMU01 e do gene que codifica a proteína irisina. Coluna 1 – marcador molecular ; coluna 2 – arcabouço pDMU01 purificado indicado pela seta vermelha; coluna 3 e 4 – gene que codifica a irisina purificado indicado pela seta vermelha; coluna 4 – marcador molecular 100pb.



### 6.5 Transformação genética do produto da ligação em *E. coli DH5αF'Iq*

A transformação genética da linhagem de célula de *E.coli Dh5αF'Iq* com o vetor recombinante pTI01 resultou em clones transformantes, obtidos em meio seletivo contendo antibiótico ampicilina.

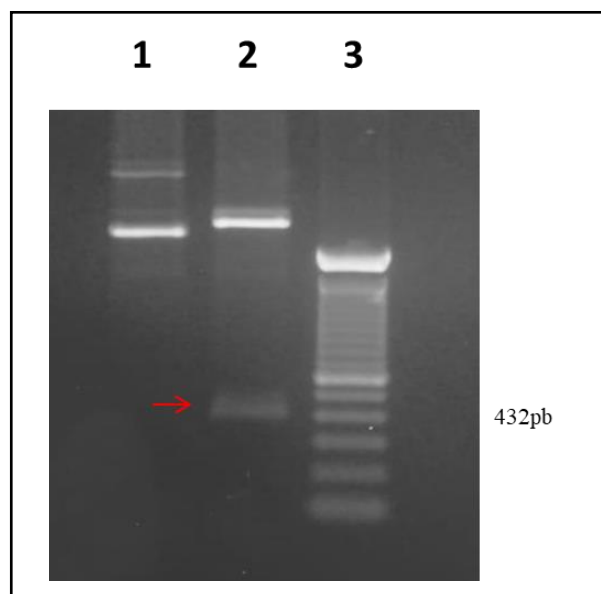
Um estudo feito por Panati e colaboradores (2018) demonstrou que a clonagem e expressão de irisina humana em células de *E.coli* é uma boa estratégia, principalmente para desenvolver testes posteriores que tenham como premissa desvendar as funções fisiológicas

do peptídeo. Nesse trabalho ele demonstrou atividade biológica positiva do peptídeo, como níveis aumentados de UCP-1, um importante marcador da termogênese.

## 6.6 Análise por restrição enzimática do vetor pTI01

Após incubação do inserto que codifica a proteína heteróloga e do vetor pDMU01 com T4 DNA ligase, transformação genética do produto da ligação e extração plasmidial, a análise em gel de agarose 1% da digestão enzimática do vetor pTI01 com *NdeI* e *BamHI* demonstrou a liberação de um fragmento de aproximadamente 432pb correspondendo ao gene sintético que codifica a irisina(FIGURA 14).

**Figura 14.** Perfil eletroforético da análise de restrição enzimática do vetor pTI01 com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. Coluna 1- pTI01 intacto após ser submetido ao processo de ligação com T4 DNA ligase (controle); coluna 2 – pTI01 digerido com as *NdeI* e *BamHI* e liberação do fragmento de 432pb indicado pela seta em vermelho; coluna 3 – marcador molecular 100pb.



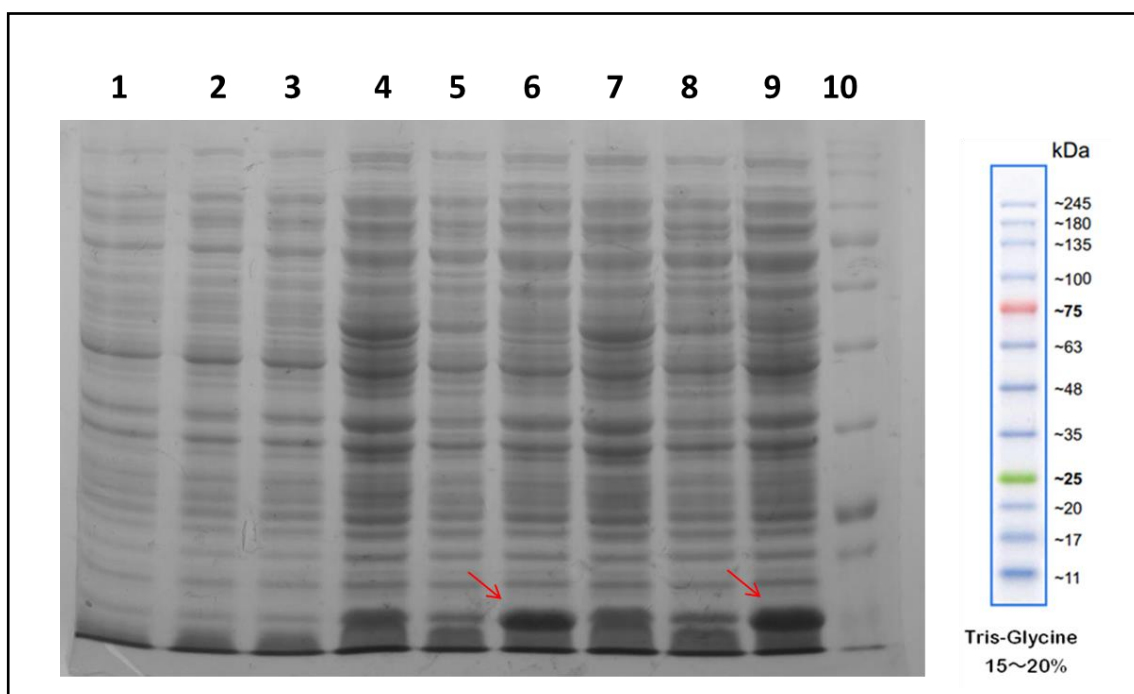
## 6.7 Indução da expressão do gene heterólogo e análise do produto por SDS-PAGE

O clone selecionado para indução da expressão cresceu satisfatoriamente. Alíquotas foram coletadas com 5 h e 10 h de indução com o IPTG (FIGURA 15). Foi possível observar



em gel de SDS-PAGE que o clone produziu a proteína recombinante após 5h de indução. É possível observá-las com uma massa aproximada de 17 kDa, correspondente ao peptídeo de fusão com o his-tag (FIGURA 15).

**Figura 15.** Perfil eletroforético da corrida em SDS-PAGE 12% da indução em célula *DH5 $\alpha$ F'Iq*. 1- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (AMP), 0 h de cultivo; 2- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (GLICOSE), 0 h de cultivo; 3- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (IPTG), 0 h de cultivo e indução; 4- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (AMP), 5 h de cultivo; 5- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (GLICOSE), 5 h de cultivo; 6- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (IPTG), 5 h de cultivo e indução; 7- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (AMP), 10 h de cultivo; 8- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (GLICOSE), 10 h de cultivo; 9- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (IPTG), 10 h de cultivo e indução; 10- marcador.



Muitos estudos relatam a irisina em diferentes massas moleculares. O estudo pioneiro dirigido por Bostrom *et al.*, relatou um peptídeo com massa de 32 kDa em sua forma glicosilada, em estudos subsequentes houve descrição da proteína com massa molecular de 12kDa e 12,5kDa (PANATI *et al.*, 2018; RIVADA *et al.*, 2013).

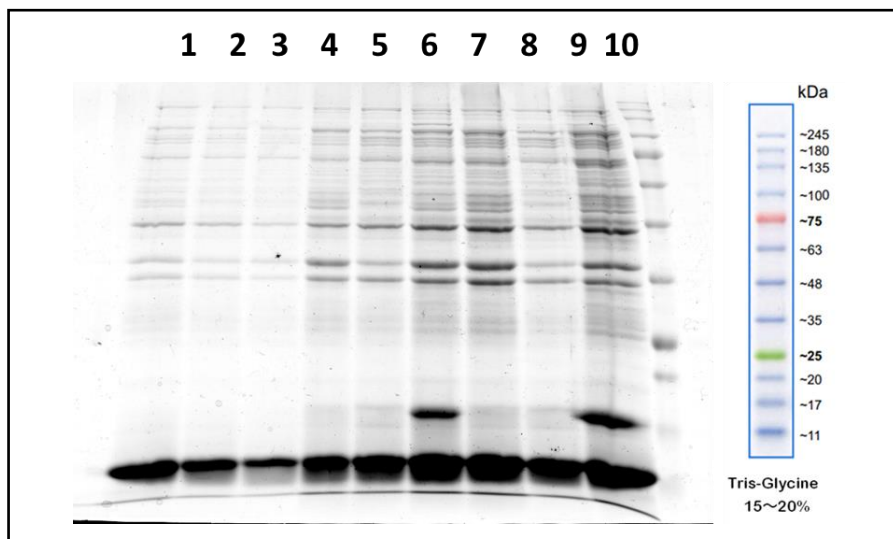
Após alinhamento das sequências (Material e métodos), no presente estudo, foi clonado e expresso um peptídeo de aproximadamente 17 kDa correspondente ao domínio irisina e 6 resíduos de histidina.

A pesquisa realizada por Boström e seus colaboradores (2012), sugeriu que a irisina tem capacidade de induzir a conversão do tecido adiposo branco em tecido adiposo bege, desde então muitos estudos vêm sendo realizados para desvendar sua interação com as funções fisiológicas.

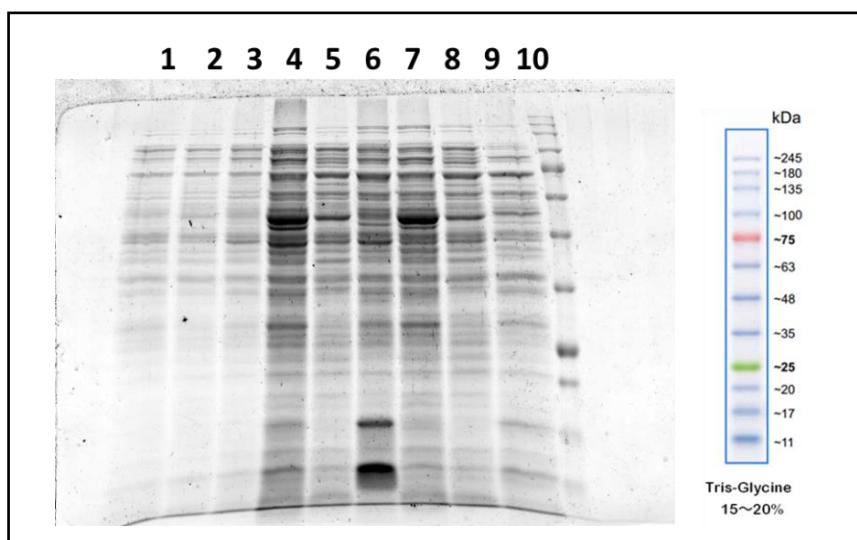
## 6.8 Obtenção dos extratos de proteínas solúveis e insolúveis e análise por SDS-PAGE

O perfil eletroforético das frações solúveis e insolúveis demonstrou que a irisina está em maior quantidade na fração insolúvel (FIGURA 16). Porém, o perfil eletroforético mostra a presença de uma banda de aproximadamente 17 KDa com 5 h de indução, indicativo que há uma fração da proteína em sua forma solúvel (FIGURA 17).

**Figura 16.** Perfil eletroforético da corrida em SDS-PAGE 12% da fração insolúvel da indução em célula *DH5 $\alpha$ F'Iq*. 1- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (AMP), 0 h de cultivo; 2- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (GLICOSE), 0 h de cultivo; 3- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (IPTG), 0 h de cultivo e indução; 4- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (AMP), 5h de cultivo; 5- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (GLICOSE), 5 h de cultivo; 6- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (IPTG), 5 h de cultivo e indução; 7- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (AMP), 10 h de cultivo; 8- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (GLICOSE), 10 h de cultivo; 9- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (IPTG), 10 h de cultivo e indução; 10- marcador..



**Figura 17.** Perfil eletroforético da corrida em SDS-PAGE 12% da fração solúvel da indução em célula *DH5 $\alpha$ F'Iq*. 1- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (AMP), 0 h de cultivo; 2- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (GLICOSE), 0 h de cultivo; 3- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (IPTG), 0 h de cultivo e indução; 4- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (AMP), 5h de cultivo; 5- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (GLICOSE), 5 h de cultivo; 6- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (IPTG), 5 h de cultivo e indução; 7- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (AMP), 10 h de cultivo; 8- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (GLICOSE), 10 h de cultivo; 9- *DH5 $\alpha$ F'Iq/pTI01* (IPTG), 10 h de cultivo e indução; 10- marcador.

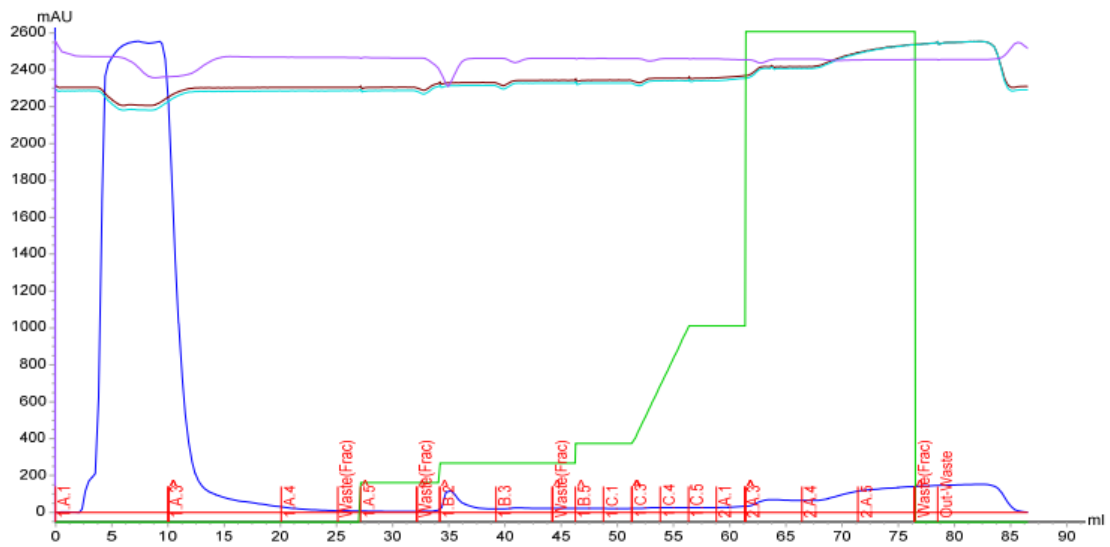


Uma das desvantagens do uso da hospedeira *E. coli* para expressão de proteína recombinante é a formação de corpúsculo de inclusão que são agregados de proteínas recombinantes insolúveis (BAIG *et al.*, 2014). Além das características físico-químicas e estruturais das proteínas, os fatores ambientais também contribuem para o dobramento incorreto das proteínas e formação dos corpúsculos de inclusão. Temperatura, pH da cultura, força de promotor e concentração do indutor podem ser otimizados para maior obtenção da proteína em sua forma solúvel (BHATWA *et al.*, 2021).

## 6.9 Purificação da proteína por cromatografia de afinidade

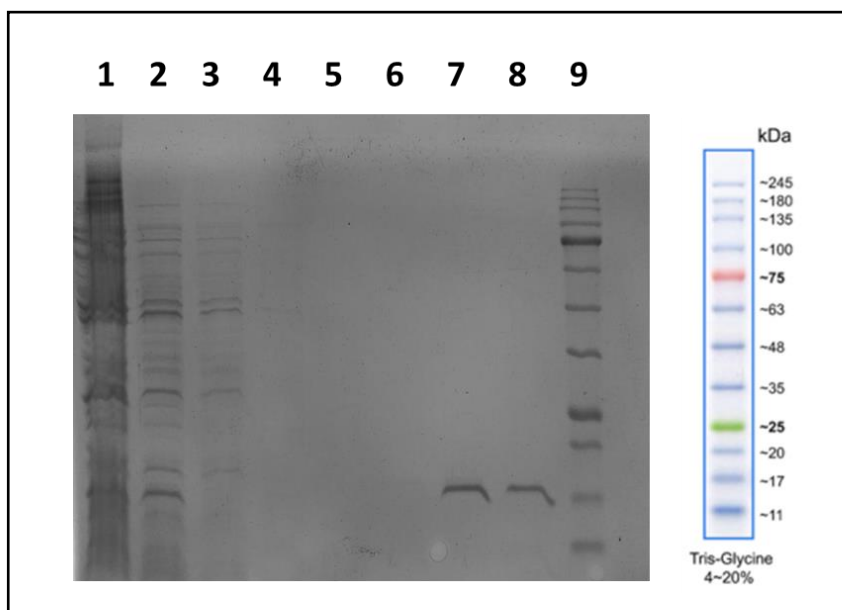
A escolha do método de purificação foi baseada na expressão do peptídeo fusionado a 6 resíduos de histidina, o que permitiu ser realizada a técnica de cromatografia de afinidade. O perfil cromatográfico demonstra um pico nas posições 2A3 e 2A4, indicativo da presença da proteína heteróloga (FIGURA 18).

**Figura 18.** Perfil cromatográfico da purificação da proteína heteróloga irisina



Após a coleta das frações foi possível observar em gel de SDS-PAGE as bandas de aproximadamente 17 kDa, correspondente ao peso molecular aproximado da proteína (FIGURA 19). Com o objetivo de validar a presença da proteína recombinante, procedeu-se ao western blot.

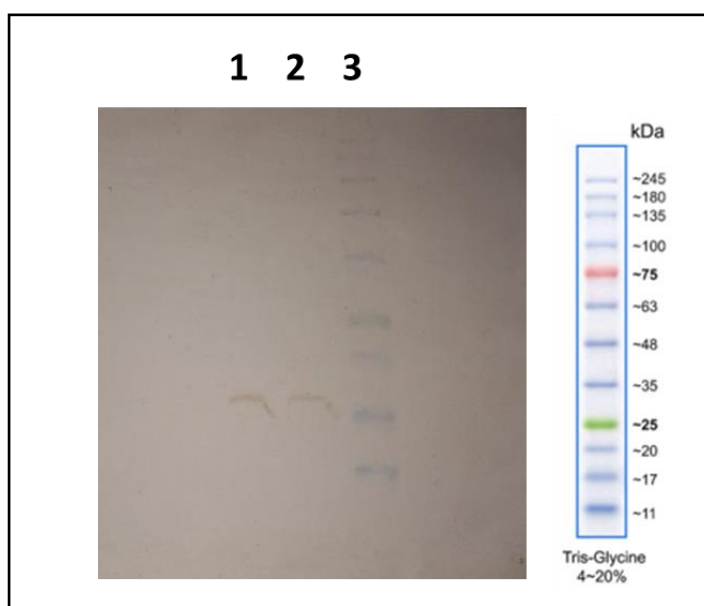
**Figura 19.** Perfil eletroforético da corrida em gel SDS-PAGE 12% das frações da purificação da proteína por cromatografia de afinidade. 1- fração insolúvel; 2- extrato bruto; 3 fração 1A3FT; 7- fração 2A3IMAC; 8- fração 2A4IMAC; 9- marcador.



## 6.10 Western Blotting

A técnica de western Blotting foi realizada com o objetivo de pesquisar a presença do peptídeo recombinante nas frações coletadas do processo de cromatografia por afinidade. O anticorpo usado no processo foi anti-6x His-tag, visto que, o peptídeo expresso estava ligado a uma cauda de histidina.

**Figura 20.** Perfil do Western Blotting das frações da proteína purificada. 1 e 2 – frações 2A3IMAC e 2A4IMAC purificadas por cromatografia de afinidade; 3- marcador molecular.



Após a revelação foi possível observar bandas de proteínas com peso molecular de aproximadamente 17 kDa correspondente à proteína heteróloga (FIGURA 20). Nessas condições experimentais, foi possível confirmar a presença da proteína heteróloga fusionada a cauda de histidina nas frações coletadas durante a técnica de cromatografia de afinidade, entretanto a técnica não foi realizada com um anticorpo anti-irisina.

## 7. CONCLUSÃO

Este trabalho propôs clonar e expressar o gene da proteína recombinante irisina canina. Os resultados deste trabalho demonstram que o sistema de expressão em *E. coli* utilizando o vetor pDMU01 sob o controle do promotor sintético (DM02) regulado pelo sistema *lac* pode ser usado para realizar a expressão desse peptídeo.

A sequência gênica foi clonada no vetor de expressão pDMU01, originando o plasmídeo recombinante pTI01. A indução da expressão do peptídeo e posterior análise em sistema eletroforético SDS-PAGE mostrou síntese proteica após 5h de indução. A purificação do peptídeo por cromatografia de afinidade e posterior análise através da técnica de western Blotting demonstra a possibilidade de obtenção da irisina para estudos posteriores.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, J. A. M. *et al.* Prevalence of canine Obesity, Obesity-related Metabolic Dysfunction, and relationship with Owner Obesity in an Obesogenic region of Spain. **In Veterinary Science**, v. 4, abr. 2017.
- ASTOLFI-FILHO *et al.* **Noções básicas de tecnologia do DNA recombinante**. Manaus: EDUA, 2005.
- ABINPET – Associação Brasileira da Indústria de Produtos para animais de Estimação. Mercado PET BRASIL 2022. São Paulo, 2022.
- BAIG, F. *et al.* Dynamic Transcriptional Response of Escherichia coli to Inclusion Body Formation. **Biotechnol Bioeng**, n. 111, v. 5, p. 980-999, maio. 2014.
- BELL, M. A. *et al.* Influence of endurance and sprinting exercise on plasma adiponectin, leptin and irisin concentrations in racing Greyhounds and sled dogs. **Australian Veterinary Journal**, v. 94, n. 5, May 2016.
- BELLIVEAU, N. M. *et al.* Systematic approach for dissecting the molecular mechanisms of transcriptional regulation in bacteria. **PNAS**, n. 21, v. 115, jul. 2018.
- BONEYX, F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. **Current opinion in Biotechnology**, Washington, v. 10, p. 411-421, 1999.
- BOSTRÖM, P. *et al.* A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, Boston, v. 48, p. 463-468, jan. 2012.
- BORNHORST, J. A; FALKE, J. J. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. **Methods Enzymol**, v. 326, p. 245-254, jul. 2010.
- BUCKHOUT-WHITE, S. *et al.* Restriction Enzymes as a Target for DNA-Based Sensing and Structural Rearrangement. **ACS OMEGA**, n. 3, p. 495-502, jan. 2018.
- BHATWA, A. *et al.* Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in Escherichia coli and Strategies to Address Them for Industrial Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, fev. 2021.
- CARROL, A. C; WONG, A. Plasmid Persistence: Costs, Benefits and the Plasmid Paradox. **Microbiology**, mar. 2018.
- DUN, S. L. Irisin-immunoreactivity in neural and non-neural cells of the rodent. **Neuroscience**, n. 14, v. 240, p. 155-162, jun. 2013.
- FREITAS, G. B; LOURENCO, M. V; FELICE, F. G. Protective actions of exercise-related FNDC5/Irisin in memory and Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, n. 155, p. 602-611, maio. 2020.
- HEAD, E. A canine model of human aging and Alzheimer's disease. **Biochim Biophys Acta**, n. 1832, v. 9, p. 1384-1380, set. 2013.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa domiciliar sobre cães e gatos: humanização e padrões de consumo – CDHPET**. Rio de Janeiro: IBGE, 2008.
- GLEESON, M. *et al.* The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature reviews**, Loughborough, v. 11, set. 2011.

- HUH, J. *et al.* FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. **Clinical Science**, n. 61, p. 1725-1738, 2012.
- IPB – Instituto Pet Brasil. Mercado Pet Brasileiro. São Paulo, 2022.
- IWASAKI, S; INGOLIA, N. Monitoring individual messenger RNAs as they make protein reveals the tricks of translation. **Science**, v. 352, jun. 2016.
- JACOB, F; MONOD, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. **Journal of Molecular Biology**, n. 3, v. 3, p. 318-356, jun. 1961.
- JONASSON, P. *et al.* Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in Escherichia coli. **Biotechnol. Appl. Biochem**, Stockholm, v. 35, p. 91-105, 2002.
- KHAN, K. Vectors Used in Gene Manipulation-A Retrospective. **Advanced Biotech Journal**, Jan. 2009.
- KIM, O. Y; SONG, J. The Role of Irisin in Alzheimer's disease. **Clinical Medicine**, n. 7, v. 407, 2018.
- KLUMPP, S; ZHANG, Z; HWA, T. Growth-rate dependent global effects on gene expression in bacteria. **Cell**, n. 139, v. 7, p. 1366, dez. 2009.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LEITE, Fernanda. **Construção de promotores para modificação genética de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae***. 2008. 81f. Dissertação (Mestrado em genética) – Universidade Federal de Pernambuco – UFP, Recife, 2008.
- LOURENCO, M. V. *et al.* Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models. **Nature medicine**, v. 25, p. 165-175, jan. 2019.
- LONG, J. M; HOLTZMAN, D. M. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. **Cell**, n. 179, v. 2, p. 312-339, out. 2019.
- MAHGOUD, M. O. *et al.* An update on the role of irisin in the regulation of endocrine and metabolic functions. **Department of Anatomy, College of Medicine & Health Sciences, United Arab Emirates**, Arab Emirates, n. 18, mar. 2018.
- MARBACH, A; BETTENBROCK, K. lac operon induction in Escherichia coli: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. **Journal of Biotechnology**, n. 1, v. 157, p. 82-88, jan. 2012.
- MESQUITA, G. *et al.* Diabetes mellitus em cães. **PUBVET**, v. 16, n. 03, p.1-8, mar. 2022.
- MIHEVEC, S. P; MAJDIC, G. Canine Cognitive Dysfunction and Alzheimer's Disease – Two Facets of the Same Disease?. **In neuroscience**, v. 3, jun. 2019.
- MIRALLES, N. F. *et al.* Biological activities of histidine-rich peptides; merging biotechnology and nanomedicine. **Microbial Cell Factories**, n. 10, v. 101, 2011.
- MORTON, T. L. *et al.* Exercise Increases and Browns Muscle Lipid in High-Fat Diet-Fed Mice. **Frontiers in Endocrinology**, Barcelona, v. 7, n. 80, p. 1-8, jun. 2016.



- NASCIMENTO, A. *et al.* **Tecnologia do dna recombinante**. Universidade de São Paulo, 2003.
- NIAZ, K. *et al.* Comparative occurrence of diabetes in canine, feline, and few wild animals and their association with pancreatic diseases and ketoacidosis with therapeutic approach. **Veterinary World**, n. 11, v. 4, p. 410-422, abril. 2018.
- NORA, L. C. *et al.* The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools. **Microbial Biotechnology**, p. 1-23, ago. 2018.
- PANATI, K. *et al.* Expression, purification and biological characterisation of recombinant human irisin (12.5 kDa). **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, n. 16, p. 459-466, 2018.
- PERAKAKIS, N. *et al.* Physiology and role of irisin in glucose homeostasis. **Nat Rev Endocrinol**, n. 13, v. 6, p. 324-337, fev. 2017.
- PINTO, C. *et al.* The selective advantage of the lac operon for Escherichia coli is conditional on diet and microbiota composition. **In microbiology**, v. 12, jun. 2021.
- PHILLIPS, K. *et al.* Diversity in lac Operon Regulation among Diverse Escherichia coli Isolates Depends on the Broader Genetic Background but. **American Society for Microbiology**, v. 19, dez. 2019.
- PORATH, J. *et al.* Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, v. 258, dez. 1975.
- PUIGSERVER, P. *et al.* A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. **Cell Press**, Boston, v. 92, p. 829-836, mar. 1998.
- PILEGAARD, H; SALTIN, B; NEUFER, P.D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 $\alpha$  gene in human skeletal muscle. **Journal of Physiology**, New Haven, v. 546, n. 3, p. 851-858, jan. 2003.
- RALSTON, A. Operons and prokaryotic gene regulation. **Nature**, n. 1, v. 1, 2008.
- RIVADA, A. T. *et al.* FNDC5/Irisin Is Not Only a Myokine but Also an Adipokine. **Plos One**, v. 8, abril. 2013.
- REDDI, H; BHATTACHARYA, A; KUMAR, V. The calcium-binding protein of Entamoeba histolytica as a fusion partner for expression of peptides in Escherichia coli. **Biotechnol. Appl. Biochem**, New Delhi, v. 36, p. 213-218, 2002.
- ROSANO, G. L; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 5, abril. 2014.
- ROHREGGER, R; SGANZERLA, A; SILVA, D. P. S. BIOLOGIA SINTÉTICA E MANIPULAÇÃO GENÉTICA: Riscos, promessas e responsabilidades. **Rev. Ambiente e Sociedade**, v. 23, 2020.
- SANTOS, V. S; WIETHÖLTER, P. Contribuições da engenharia genética no tratamento de doenças. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, n. 3 v. 7, p. 31157-31176, mar. 2021.
- SHAHRAVAN, S. H. *et al.* Enhancing the specificity of the enterokinase cleavage reaction to promote efficient cleavage of a fusion tag. **Protein Expr Purif**, n. 59, v. 2, p. 314-319, jun. 2008.

- SCARABUCCI, Patrícia. **Pesquisa de sangue oculto fecal em caninos diabéticos pelos métodos de benzydina e guaiac**. 2018. 37f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de UBERLÂNDIA – UFU, Uberlândia, 2018.
- SCHUMACHER, M. *et al.* The Structure of Irisin Reveals a Novel Intersubunit -Sheet Fibronectin Type III (FNIII) Dimer. **Journal of Biological Chemistry**, U.S.A, n. 47, v. 288, p. 33738 –33744, nov. 2013.
- TVARIJONAVICIUTE, A. *et al.* Obesity-related metabolic dysfunction in dogs: a comparison with human metabolic syndrome. **Veterinary Research**, n. 8, p. 147, 2012.
- ULLMANN, A. Escherichia coli Lactose Operon. **Encyclopedia of life sciences**, Chichester, mar. 2009.
- VASCONCELOS, F. T. G. R, *et al.* Revisitando o dogma central: a relação entre genes e proteínas. **Sociedade Brasileira de Genética**, n. 2, v. 16, 2021.
- VARELLA, P. P. V, FORTES, W. C. N. Citokines. **a review. Rev. bras. alerg. imunopatol.** São Paulo, v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001.
- VEDOVELI, N. C. P. S; CASTRO, V. P. Manual de construção de vetores de expressão. **FUNDHERP**. Ribeirão Preto, 2016.
- WASSEN, R. *et al.* FNDC5/Irisin: Physiology and Pathophysiology. **Molecules**, 2022.
- WATSON, James *et al.* **Biologia Molecular do Gene**. 7ª ed. São Paulo: ARTMED, 2015.
- WRANN, C. D. FNDC5/Irisin – Their Role in the Nervous System and as a Mediator for Beneficial Effects of Exercise on the Brain. **Harvard Medical School**, Boston, v. 1, p. 55-61, 2015.
- WRANN, C. D. *et al.* Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 $\alpha$ /FNDC5 pathway. **Cell metab**, n. 18, v. 5, p. 649-659, nov. 2013.
- WÖHLKE, Jonathan. **Construção de vetores de expressão para *Escherichia coli* baseados em promotores ativos na fase estacionária de crescimento**. 2012. 81f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do AMAZONAS – UFAM, Manaus, Amazonas, 2012.
- ZHANG, Y. *et al.* Irisin exerts dual effects on browning and adipogenesis of human white adipocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, Gainesville, n. 311, p. E530-E541, jul. 2016.
- ZHANG, Y. *et al.* Irisin Stimulates Browning of White Adipocytes through Mitogen-Activated: Protein Kinase p38 MAP Kinase and ERK MAP Kinase Signaling. **American Diabetes Association**, Columb, n. 1, Out. 2013.
- ZHANG, J; ZHANG, W. Can irisin be a linker between physical activity and brain function?. **Biomol Concepts**, maio. 2016.

