

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – CEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BRUNA MARTINS DA SILVA

**EXPRESSÃO HETEROLOGA DAS PROTEÍNAS GDF9 E BMP15 DE BOVINOS EM
SISTEMA PROCARIOTO PARA IMUNIZAÇÃO DE FÊMEAS *HYDROCHOERUS*
HYDROCHAERIS (CAPIVARA)**

BRASÍLIA

2022

BRUNA MARTINS DA SILVA

**EXPRESSÃO HETEROLOGA DAS PROTEÍNAS GDF9 E BMP15 DE BOVINOS EM
SISTEMA PROCARIOTO PARA IMUNIZAÇÃO DE FÊMEAS HYDROCHOERUS
HYDROCHAERIS (CAPIVARA)**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós – Graduação e Pesquisa

Orientação: Andrei Antonioni Guedes Fidelis

BRASÍLIA

2022

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rita Regina e Odorico Andrade, por acreditarem em todo meu potencial e me incentivarem a cada dia me tornar a melhor versão de mim mesma.

Ao meu querido irmão bem como meus gatos por me lembrarem a cada dia que eu não estou sozinha nesta jornada e por todo conforto e carinho da melhor forma que vocês puderam me proporcionar.

Ao meu orientador Dr. Eduardo de Oliveira Melo por compartilhar seus conhecimentos. Sempre atencioso e demonstrando grande carinho e paciência. Meus sinceros agradecimentos!

Ao meu orientador Andrei Fidelis por me permitir essa oportunidade única de poder realizar um sonho de criança bem como seus grandes ensinamentos.

A todos do Laboratório de Reprodução Animal que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

RESUMO

A espécie bacteriana *Escherichia coli* foi a primeira a ser utilizada para a produção de moléculas com a tecnologia de DNA recombinante. Na atualidade várias cepas do microrganismo citado podem ser utilizadas para a fabricação de proteínas recombinantes. Exemplos de polipeptídios que podem ser fabricados com a tecnologia supracitada são GDF9 e o BMP15 que desempenham um papel crucial no desenvolvimento do folículo ovariano podendo assim atuar como método contraceptivo não invasivo em animais. Diante disso, o objetivo desta pesquisa foi expressar os genes GDF9 e BMP15 de bovinos utilizando bactérias *E. coli*. As proteínas supracitadas com um valor de banda entre 15 e 19 KDa foram bem expressas, fato verificado com a técnica de eletroforese SDS-PAGE, porém deparou-se com o obstáculo da formação de corpos de inclusão e agregados proteicos precipitados, levando assim a adoção de novas abordagens no experimento a fim de minimizar esses problemas e manter uma alta expressão das proteínas em sua forma solúvel em meio fisiológico. Para reduzir o problema da precipitação das proteínas foram testadas 6 linhagens de *E. coli* com genótipo e características distintas. Verificou-se que para as 6 cepas utilizadas a temperatura de 20°C por um período de 16 a 18h conhecido por overnight apresentava uma ótima expressão. A quantidade de indutor isopropil β -d-1-tiogalactopiranosídeo ideal para cada estirpe variou uma vez que não há uma estratégia universal para todos os casos de expressão. Acerca da solubilidade das proteínas, foi verificado que para as cepas testadas que as alterações de protocolo foram benéficas. Mais experimentos precisam ser realizados a fim de purificar as proteínas alvo contornando a problemática da expressão heteróloga e assim dando continuidade ao projeto.

Palavras-chave: GDF9; BMP15; Expressão heteróloga; Proteína recombinante; *Escherichia coli*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	6
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	7
2.1	PROTEÍNAS HETERÓLOGAS	7
2.2	GDF9 E BMP15.....	7
2.3	FARTORES QUE AFETAM A EXPRESSÃO HETERÓLOGA.....	9
2.4	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	12
2.4.1	E. COLI BL21 (DE3)	13
2.4.2	E. COLI BL 21 STAR (DE3).....	13
2.4.3	E. COLI ARCTIC EXPRESS E CODON PLUS RIL	13
2.4.4	E. COLI ORIGAMI E SHUFFLE.....	14
3	MÉTODO.....	15
4	RESULTADOS.....	18
5	DISCUSSÃO	28
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia DNA recombinante (rDNA) foi criada por volta de 1973 e por intermédio desta, hoje é possível alterar o material genético de um organismo a fim de se obter produtos desejados como, por exemplo, proteínas. Exemplos de polipeptídios que podem ser fabricados com tal tecnologia são o GDF9 (*growth/differentiation factor*) e o BMP15 (*bone morphogenetic protein 15*)

O GDF9 e o BMP15 fazem parte da superfamília TGF- β (*transforming growth factor- β*) e em roedores bem como em outras espécies de mamíferos, desempenham um papel crucial no desenvolvimento do folículo ovariano. A forma recombinante dessas proteínas possui a capacidade de mimetizar a ação parácrina no oócito nas células da granulosa, podendo influenciar na foliculogênese. Dessa forma o estudo de tais fatores pode fornecer novas oportunidades para o desenvolvimento de métodos contraceptivos não invasivos (1).

A aplicação de tais metodologias anticoncepcionais podem ser aplicadas em espécies como capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Esses roedores estão amplamente distribuídos pela América do Sul mostrando uma grande capacidade de adaptação ao ambiente que aliado ao desaparecimento de seus predadores naturais levou a um crescimento acentuado de sua população. Tal fato caracteriza-se como um sério problema uma vez que consideráveis danos a agricultura que geram significativo impacto econômico além de aumentar o risco de transmissão de doenças como a febre maculosa. Entretanto, como se trata de uma espécie selvagem nativa, as capivaras estão sob proteção do IBAMA e seu controle populacional é complicado, o que abre margem para a exploração de métodos contraceptivos não invasivos (2–4).

O microrganismo *Escherichia coli* pode ser utilizado para produção de GDF9 e BMP15 recombinantes, todavia pesquisadores normalmente se deparam com algumas problemáticas na expressão de proteínas como, por exemplo, a solubilidade dessas (5). Perante o exposto, o objetivo geral de tal pesquisa foi expressar os genes GDF9 e BMP15 de bovinos utilizando bactérias *Escherichia coli* com o intuito de realizar um método contraceptivo não invasivo em fêmeas de mamíferos, com especial atenção para capivaras. Especificamente, buscou-se avaliar a expressão do GDF9 e BMP15 em diferentes estirpes de *E. coli* bem como buscar alternativas de minimizar a problemática com a solubilização das proteínas mantendo uma alta taxa de expressão dessas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PROTEÍNAS HETERÓLOGAS

A tecnologia DNA recombinante (rDNA) foi concebida e aplicada em 1973 por Paul Berg, Herbert Boyer, Annie Chang, e Stanley Cohen, e por intermédio desta, hoje é possível alterar o material genético de um organismo a fim de obter características aprimoradas e produtos desejados como, por exemplo, proteínas (6).

A produção de proteínas recombinantes por ferramentas da engenharia genética tem sido objeto de pesquisas por vários grupos. Os recentes avanços desta possibilitaram a aplicações destas proteínas em terapias, as quais impactaram na melhoria das condições de saúde de seres humanos e animais, a partir do desenvolvimento de vacinas e outros produtos farmacêuticos (6,7). As proteínas recombinantes podem ser fabricadas em células bacterianas, fungos, insetos ou de mamíferos (8).

A espécie bacteriana *Escherichia coli* foi a primeira a ser utilizada na produção de proteínas recombinantes com a produção da insulina humana em 1978. Antes da fabricação de tal molécula, a humanidade dependia de insulina oriunda do pâncreas de suínos e bovinos em que a disponibilidade desse recurso não correspondia às necessidades dos diabéticos (5,9,10).

Outro acontecimento notável na fabricação de proteínas recombinantes utilizando a espécie *E. coli* ocorreu na metade da década de 1980 com o advento do hormônio de crescimento humano recombinante (do inglês, rhGH). Isso proporcionou uma fonte mais fácil, segura e abundante de somatotropina para indivíduos com anomalias no crescimento eliminando, assim, a necessidade de preparações oriundas de cadáveres (8,11).

2.2 GDF9 E BMP15

A superfamília TGF- β trata-se de um diverso grupo de proteínas com, aproximadamente, 35 representantes nos vertebrados, os quais são classificados em subfamílias, hormônio antimülleriano, fator neurotrófico derivado de células gliais, ativinas, duas inibinas, uma extensa família de 20 proteínas morfogenéticas ósseas denominadas BMP e 9 fatores de crescimento e diferenciação conhecidos como GDF que estão intimamente relacionados ao grupo BMP (12–14).

Os fatores dessa superfamília realizam funções que envolvem inúmeros processos fisiológicos como uma modulação do ciclo celular além de atuação gonadal (12,13,15,16).

O desenvolvimento folicular ovariano é determinado por uma complexa troca de sinais entre a glândula pituitária e o ovário. Tal coordenação é essencial a fim de que se produza um oócito totalmente competente para que esse seja submetido à fertilização (17,18).

Nos bovinos esses fatores são evidentes em todos os estágios do desenvolvimento folicular. Essas moléculas agem diretamente nas células da granulosa proporcionando seu crescimento e diferenciação, atuando desde o processo de maturação, ovulação, fecundação e luteinização dos folículos em mamíferos (16–19).

A importância do GDF9 e BMP15 nos eventos supramencionados é evidenciada em problemas reprodutivos e baixa fertilidade em indivíduos que apresentam deleções ou até mesmo mutações nos genes que codificam esses fatores (18).

Diante do exposto, um exemplo que pode ser citado foi o experimento conduzido por Galloway (20) com ovelhas Inverdale, animais que possuem uma mutação *X-linked* que aumenta a taxa de ovulação bem como o número de nascimentos por estro em heterozigotos (FecXI/FecX+), e ovelhas da família Hanna com o mesmo fenótipo *X-linked* (FecXH). Neste experimento animais de ambas famílias foram cruzados entre si produzindo animais que fenotipicamente eram inférteis, bem como o genótipo homozigoto Inverdale (FecXI/FecXI). Tal fato decorre de mutações independentes que existem em FecXI e FecXH para o gene que codifica o BMP15, mostrando assim a importância desse fator para a fertilidade feminina.

Sem esses fatores, os ovócitos continuam a crescer, sendo suportados por células da granulosa residuais, até o momento em que esses tornam-se impossibilitados de continuarem degenerando-se. Experimentos realizados com o *knockout* genético do GDF9 mostram que a ausência desse bloqueia o desenvolvimento dos folículos pré antráis levando assim a infertilidade de camundongos fêmeas transgênicos já o *knockout* de BMP15 leva a um fenótipo de subfertilidade. Quando o genótipo BMP15^{-/-} é introduzido ao GDF9^{+/-}, as fêmeas resultantes mostram severos danos na morfologia do ovário bem como esterilidade o que demonstra a harmonia e a relevância desses fatores para o organismo(19–21).

Deve-se salientar que em experimentos em organismos vivos, o efeito fisiológico do GDF9 e BMP15 dependem da espécie em questão diante das diferenças de morfologia e fisiologia reprodutivas existentes entre os indivíduos do reino animal. Perante a Lan (22) a superexpressão de BMP15 e GDF9 durante o período do diestro tem por consequência a

hipofertilidade, com tamanho de ninhada reduzido e um ciclo estral mais prolongado em camundongos (1).

Estudos realizados em ovelhas com imunizações repetidas de sequencias de aminoácidos do BMP15 e GDF9 mostrou inibição do desenvolvimento folicular normal bem como a ovulação demonstrando assim que tal metodologia pode ser aplicada como estratégia contraceptiva em variadas espécies animais. Em tais estudos foram injetados peptídeos BMP15 e GDF9 conjugados com hemocianina de lapa buraco de fechadura 4 vezes consecutivas a cada 28 dias e como resultado obteve-se uma significativa redução do número de animais que ovularam 16 dias após a primeira imunização e ao final do estudo nenhum dos animais ovularam (23).

2.3 FATORES QUE AFETAM A EXPRESSÃO HETERÓLOGA

2.3.1 CORPOS DE INCLUSÃO

De acordo com a literatura, alguns problemas na expressão de proteínas (PTNs) são descritos. Dentre eles há a superexpressão de PTNs bem como a solubilidade dessas em bactérias *E. coli*, se manifestando a partir de agregados proteicos insolúveis que se sedimentam durante a centrifugação da amostra em pelotas (pellets) visíveis (5,24).

Tal obstáculo conhecido como corpos de inclusão possui mecanismos de formação que não são completamente entendidos. Todavia sabe-se que a falha em alcançar com rapidez a conformação nativa ou a interação com moduladores de dobramento (chaperonas) pode causar a deposição parcial ou completa dessa proteína heteróloga nos agregados de inclusão, em forma de precipitados insolúveis. Outra hipótese se baseia na incapacidade de a cepa bacteriana dar o aporte necessário para as modificações pós traducionais, por exemplo, a formação de pontes de dissulfeto no citoplasma. Como consequência disso, há uma na agregação dessas moléculas, as quais tornam-se inativas (25–27).

Os corpos de inclusão podem se acumular no citoplasma da célula em concentrações cerca de 25% maiores do que a quantidade de proteínas solúveis e não apenas a molécula alvo pode compor o agregado como também algumas proteínas IbpA e IbpB (*inclusion body associated proteins*) (25,27).

As proteínas IbpA e IbpB são pequenas proteínas, com cerca de 16 kDa, de choque térmico que previnem a agregação irreversível da molécula alvo em que, sob condições

adequadas, transferem o polipeptídeo alvo para chaperonas dependentes de ATP como a DnaK para que essas sejam redobradas ou degradadas (28–30).

De acordo com Gopal e Kumar (5) há 5 estratégias que podem ser adotadas a fim de evitar o acontecimento de corpos de inclusão a partir do aumento da solubilização da proteína heteróloga:

- 1) Mudar o vetor, o promotor do gene de interesse ou até mesmo mudar a 'tag' proteica, ou seja, a sequência de peptídeos que são geneticamente colocados na proteína alvo;
- 2) Mudar a cepa hospedeira;
- 3) Mudar os parâmetros de cultivo da proteína recombinante;
- 4) Co-expressão com outros genes como, por exemplo, genes de chaperonas a fim de manter a estabilidade da proteína alvo;
- 5) Mudar a sequência de genes da proteína alvo

Uma vez que corpos de inclusão possuem resistência à ação proteolítica, esses possuem grande quantidade de material puro, tendo cerca de 80 a 95% de sua composição a proteína alvo. Diante de tal fato, a formação de corpos de inclusão é constantemente explorada, sobretudo para proteínas que são fáceis de redobrar (25,27,29).

2.3.2 DEGRADAÇÃO PROTEOLÍTICA

Além dos corpos de inclusão, a falha em alcançar com rapidez a conformação nativa ou a interação com moduladores de dobramento pode causar a degradação da proteína heteróloga. Tal degradação de proteínas mal formadas ocorre pela ação de proteases as quais eliminam o acúmulo de material potencialmente perigoso e indesejado para a bactéria. Essas proteases apresentam uma separação física no interior da célula com o intuito de reduzir a atividade não específica dessas. Entretanto, para acessar proteínas recombinantes tal compartimento deve ser rompido e uma vez que isso ocorre as proteases conseguem acessar a proteína alvo levando a proteólise (25,31).

A degradação da proteína heteróloga também pode ocorrer durante o processo de purificação dessa molécula. Segundo Ryan e Henehan (31), tal fato não se caracteriza como um problema caso medidas para inativar proteases foram tomadas na fase de lise celular. Apesar disso, as proteases podem ser transportadas junto com a proteína purificada e conseqüentemente levando à degradação gradual durante o armazenamento (32).

Uma estratégia que pode ser adotada para evitar esse evento de degradação é a utilização de cepas hospedeiras com mutações em genes de protease como a estirpe de *E. coli* BL21(DE3). Todavia, essa abordagem pode conter algumas desvantagens como, por exemplo, a redução das taxas de crescimento celular. Outra alternativa que pode ser praticada seria levar a expressão do polipeptídeo de interesse em corpos de inclusão, os quais normalmente são protegidos da proteólise (25,31,32).

O processo de glicosilação pode ser uma forma de promover a proteção contra a atividade proteolítica. Ainda, essa modificação pós-traducional é responsável pela manutenção da conformidade e estabilidade da proteína, além de auxiliar na adesão à célula. Para as proteínas GDF9 e BMP15 estudadas a glicosilação é uma importante modificação para que tais moléculas sejam reconhecidas por seus receptores garantindo assim a sua bioatividade todavia o sistema de expressão baseado em bactérias *E. coli* não apresenta bioatividade total uma vez que essa espécie não realiza o processo de glicosilação das moléculas (21,33–36).

2.3.3 CODON USAGE BIAS

Quando o polipeptídeo de interesse não é detectado por técnicas sensíveis como o *Western blot* ou é detectado em concentrações muito baixas, especula-se a ocorrência de um viés do uso do código genético, fenômeno conhecido como “*Codon Usage Bias*”. Tal enviesamento é pautado no fato de que diferentes organismos possuem frequências distintas da ocorrência de códons que são sinônimos, ou seja, algumas trincas são raramente usadas em comparação a outras em um mesmo organismo e entre seres de diferentes espécies. De acordo com a literatura, o *codon usage bias* ocorre em consequência do equilíbrio entre seleção natural, mutações e drift genético (37–39).

O código genético de todos os organismos conhecidos utiliza 61 combinações de três nucleotídeos (códons) para codificar 20 aminoácidos. Um mesmo aminoácido pode ser codificado por mais de um códon dando assim ao código genético a característica de degenerado. As tríades de nucleotídeos são interpretadas pelos ribossomos de modo que RNA transportadores (tRNA) apropriados carreguem o aminoácido desejado correspondente a leitura da organela. Perante ao explanado, códons preferidos pelos organismos se relacionam com a maior quantidade de tRNA cognatos disponíveis na célula e essa relação serve para otimizar o sistema de tradução e equilibrar a concentração entre códons e isoacceptor tRNA.

Um exemplo para o citado é o tRNA que corresponde aos códons AGG e AGA em bactérias *E. coli* que não são utilizados frequentemente fazendo com que esses estejam presentes na em poucos níveis na célula (40).

Diante do exposto, os códons preferenciais da célula normalmente irão ocorrer em genes altamente expressos, enquanto as trincas mais raras possuem a tendência de estar em genes expressos em pequena quantidade de estar em genes expressos em pequena quantidade. Tal fato pode criar um obstáculo na expressão da proteína alvo uma vez que caso o objetivo seja produzir altas quantidades desse composto, porém o RNA mensageiro (mRNA) possui na sua distribuição de códons raros em bactérias (Tabela 1) é provável que ocorram problemas de tradução levando assim a uma redução da quantidade ou qualidade do polipeptídeo sintetizado (37,41).

Tabela 1: Códons usados por *E. coli*, *Homo Sapiens* e *Saccharomyces cerevisiae* numa frequência por 1000 códons.

Códons raros	Aminoácido codificado	Frequência por 1000 códons		
		<i>E. coli</i>	<i>Homo Sapiens</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
AGG/AGA	Arg	2,1/3,6	11,4/11,5	9,2/21,3
CGA	Arg	3,8	6,3	3,0
CUA	Leu	4,2	6,9	13,4
AUA	Ile	6,8	7,1	17,8
CCC	Pro	5,4	20,0	6,8
CGG	Arg	5,9	11,9	1,7
UGU	Cys	5,2	9,9	8,0
UGC	Cys	6,1	12,2	4,7
ACA	Thr	9,3	14,8	17,8

Fonte: GenScript OptimumGene™

A problemática do *codon usage bias* influenciando na expressão gênica pode ser contornada utilizando sequências de genes que já estejam otimizadas para a cepa bacteriana hospedeira, como BL21 Codon Plus RIL, as quais possuem plasmídeos com genes extras para RNA transportadores (tRNA) raros (40,42).

2.4 *ESCHERICHIA COLI*

Há mais de 20 anos a *E. coli* vem sendo amplamente utilizada em laboratórios pelas boas condições de cultivo *in vitro* e facilidade de manipulação genética (5).

Há uma grande variedade de cepas de *E. coli* disponíveis bem como um extenso número de plasmídeos recombinantes à disposição (43).

Cada cepa possui suas vantagens e desvantagens em que a linhagem bacteriana BL21 (DE3) e seus derivados são as cepas mais utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes (44). Nosso experimento utilizou 6 linhagens (variantes) da *E. coli* BL21, que serão descritas a seguir.

2.4.1 E. COLI BL21 (DE3)

A expressão de proteínas recombinantes na estirpe BL21 (DE3) é obtida através de um forte sistema de indução de um promotor T7. Além de tal fato, há a deleção de genes para as proteases Lon, que atua degradando proteínas forasteiras, e a OmpT a qual degenera proteínas extracelulares, fato que pode ocorrer após a lise celular (5,43,44).

Um episódio que pode ocorrer com a cepa BL21(DE3) é a expressão em nível basal, ou expressão vazada, do gene de interesse gerando assim uma toxicidade da proteína produzida. Esse acontecimento interfere na homeostase e proliferação do microrganismo resultando em baixa densidade celular final e possível morte bacteriana. Para minimizar tal problemática é possível a utilização da linhagem BL 21 (DE3) pLys S/E que possuem o gene da lizosima a qual degrada a polimerase T7 basal e inibe a sua expressão residual, reduzindo com isso a sua expressão na ausência do seu indutor específico, o IPTG (5,45,46).

2.4.2 E. COLI BL 21 STAR (DE3)

Outras derivações da cepa BL21 (DE3) possuem vantagens distintas, por exemplo, estirpes de *E. coli* BL 21 star que são capazes de conferir alta estabilidade ao RNA mensageiro (mRNA) e conseqüentemente um aumento na expressão gênica devido a uma mutação no gene *rne* 131 (que codifica a ribonuclease E 131) que aumenta a degradação dos mRNAs de uma forma geral (5).

2.4.3 E. COLI ARCTIC EXPRESS E CODON PLUS RIL

Já as cepas conhecidas pelo nome Arctic Express são geneticamente alteradas para expressar chaperonas Cpn10 e Cpn60, provenientes da bactéria psicrófila *Oleispira antarctica*, as quais são adaptadas a baixas temperaturas o que permite assim a redução da temperatura de cultivo da bactéria hospedeira. Ainda há a cepa nomeada como Codon Plus RIL a qual pode ser utilizada a fim de ultrapassar o viés que pode existir em um genoma rico em seqüências AT ultrapassando assim a problemática do *codon usage bias*(5).

2.4.4 E. COLI ORIGAMI E SHUFFLE

Por fim, existe as estirpes Origami e Shuffle que, perante a dados de seus fabricantes, podem ser derivadas não da linhagem BL21, mas sim da cepa E. coli K-12. A cepa de E. coli Origami possui uma mutação nos genes de redutase tiredoxina (*trxB*) e glutathiona redutase (*gor*) que permite a formação de pontes de dissulfeto dentro do citosol celular para as proteínas que requerem essa formação para um dobramento adequado. Em comparação a cepa Origami, a estirpe Shuffle expressa o gene *DsbC* no citosol levando assim a uma formação apropriada das pontes de dissulfeto (5). Como as proteínas GDF9 e BMP15 possuem cisteínas que formam pontes de dissulfeto, essas linhagens podem ter uma boa resposta na produção dessas PTNs (21).

3 MÉTODO

Para a expressão dos genes GDF9 e BMP15, a região codante dos peptídeos maduros foram clonadas em vetores pET21a e pET21b, respectivamente, com a introdução de um His-tag de seis histidinas que facilitam a purificação das proteínas expressas por cromatografia de afinidade. Os vetores construídos foram transformados em seis cepas bacterianas de *E. coli* (Tabela 2). Tais linhagens foram transformadas seguindo o método descrito por Inoue (47) o qual utiliza o choque térmico para permitir a permeabilização das membranas bacterianas ao DNA plasmidial.

Tabela 2: Número de catálogo, nome de linhagens e seus fabricantes utilizados no experimento.

Nome da linhagem	Número de catálogo	Fabricante
BL21 (DE3) pLysS/E	69450-M	Novagen
BL21 star	C601003	Invitrogen
Arctic Express	230192	Agilent
Origami	70837	Novagen
Shuffle	C3029J	New England BioLabs (NEB)
Codon Plus RIL	230245	Agilent

Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2021

As bactérias transformadas foram cultivadas em placas com meio LB (Lúria - Bertani) + ágar contendo também ampicilina (100 µg/mL), posto que o plasmídeo utilizado apresenta gene de resistência a este antibiótico. Tais placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16-18 horas (Overnight) e em seguida armazenadas sob refrigeração até serem usadas posteriormente.

A posteriori, uma colônia de cada placa foi selecionada e cultivada em 2 ml de meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL) pelo período de overnight (ON). No dia seguinte, caso a turbidez dos tubos seja confirmada, cada amostra foi inoculada por 2:30h à 37°C/250 RPM seguindo a proporção de 1 ml do cultivo para cada 100 ml de meio LB + ampicilina (100 µg/mL).

Em seguida, tais amostras foram induzidas inicialmente com concentração igual à 0,2 mM de IPTG (isopropil β-d-1-tiogalactopiranósido) em diferentes temperaturas e tempos (Tabela 3). Subsequentemente, quando a temperatura e tempo de incubação ideais foram ajustados, foram realizados experimentos com a concentração de IPTG adequada para uma boa indução das amostras (0,1; 0,2; 0,5 e 1 mM).

Tabela 3: Tempos e temperaturas de indução utilizados para diferentes cepas de *E. coli*.

Cepa bacteriana	Temperaturas	Tempos de incubação
BL21 (DE3) pLysS/E	28°C	1h; 2h; 3h e 4h
BL21 star	18°C; 20°C; 25°C e 28°C	4h; 16h; 28h e 44h
Arctic Express	15°C e 20°C	4h; 16h e 32h
Origami	20°C e 28°C	4h e 16h
Shuffle	20°C e 28°C	4h e 16h
Codon Plus RIL	20°C e 25°C	4h e 16h

Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2021

Após estipulado a quantidade de indutor adequada para cada estirpe bacteriana, experimentos acerca do meio mais adequado para o cultivo das bactérias foram realizados. Desse modo, uma colônia de cada placa foi selecionada e cultivada em 2 ml de meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL) e em 2 ml de meio TB (terrific broth) líquido com ampicilina (100 µg/mL) pelo período de overnight (ON). No dia seguinte, caso a turbidez dos tubos seja confirmada, cada amostra foi inoculada à 37°C/250 RPM seguindo a proporção de 1 ml do cultivo para cada 100 ml de meio líquido + ampicilina (100 µg/mL) até atingir as densidades ópticas de 0,5 e 2,0.

Posteriormente, foi testado a solubilidade das proteínas expressas a partir da lise das células cultivadas utilizando a sonicação, metodologia aplicada no laboratório a fim de extrair as proteínas produzidas que consiste, em suma, na aplicação de energia ultrassônica na amostra líquida a fim de agitar as partículas e por consequência lisar as células bacterianas (48,49). A sonicação foi realizada utilizando dois tipos distintos de solução tampão (Tabela 4) seguindo o seguinte protocolo: para cada 30 ml de inóculo adicionar 5 ml de TS-3 no primeiro e segundo ciclo de sonicação e adicionar 5 ml de TS-1 no terceiro e quarto ciclo de sonicação.

Tabela 4: Tampões de sonicação utilizados, suas composições e pH.

Tampão	Composição	pH
Tampão de sonicação 1 (TS-1)	20 mM Na ₂ HPO ₄ 40 mM Imidazol	11
Tampão de sonicação 3 (TS-3)	50 mM Tris base 150 mM NaCl 10% Glicerol	12

Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2022

Em todos os experimentos, foi utilizado a técnica de eletroforese SDS-PAGE a fim de verificar os resultados obtidos. Por intermédio de tal metodologia é possível proporcionar o movimento de moléculas carregadas, como proteínas, em uma matriz de gel sob campo

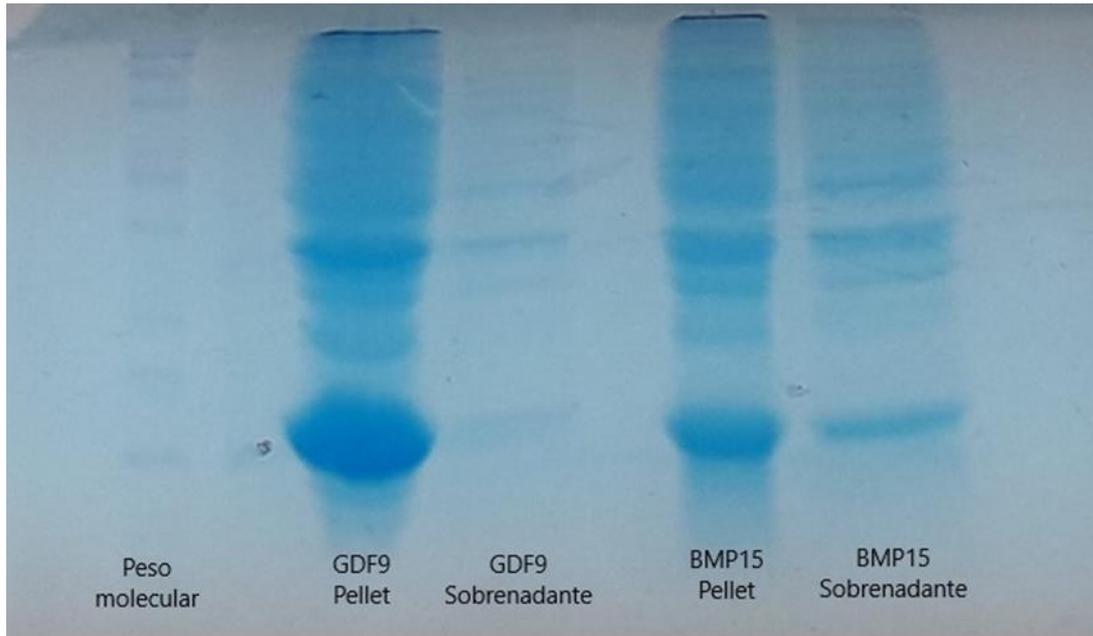
elétrico, que separa as PTNs por seu peso molecular. O SDS-PAGE é um método importante na análise de PTNs em laboratórios por propiciar uma estimativa do número de proteínas diferentes geradas, seu peso molecular, bem como o grau de pureza da amostra (50).

Perante ao relatado por Sambrook e Russel (51) geralmente é utilizado a técnica de eletroforese de proteínas associado a géis de poliacrilamida com uma concentração que pode variar de 8 a 20%, os quais formam compostos de cadeias de polímeros reticulados de poliacrilamida que retardam a migração das proteínas (50). Tais géis são utilizados em combinação a um forte detergente aniônico denominado por SDS (dodecilsulfato de sódio) bem como o aquecimento das amostras a fim de proporcionar, dentre outras coisas, a desnaturação e o desdobramento parcial de proteínas e assim permitir a análise da molécula desejada (50). A concentração do gel de poliacrilamida varia de acordo com o tamanho da PTN a ser analisada. No caso utilizamos a concentração de 15% para as primeiras análises de BMP15 e GDF9. Mais adiante, por uma contaminação das soluções stock para a elaboração dos géis, bem como a baixa resolução das imagens obtidas, foi adotado uma metodologia utilizando as concentrações de 17,5% e 20% além da não utilização do SDS na composição dos géis.

4 RESULTADOS

Durante a expressão de proteínas na cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/E a partir de análises de géis de poliacrilamida pela técnica de eletroforese foi possível identificar a maior expressão das proteínas desejadas em pellets (precipitado) e não na fração solúvel (sobrenadante) oriunda de células lisadas (Figura 1). Os resultados também mostram que as proteínas alvo apresentavam o tamanho desejado entre 15 e 19 Kda.

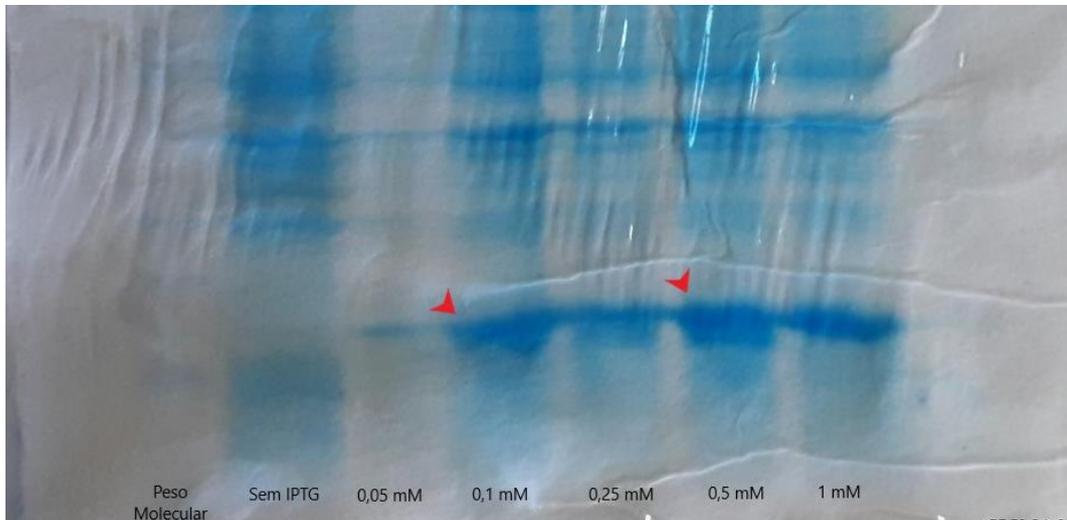
Figura 1: Gel de poliacrilamida (15%) com amostras de GDF9 e BMP15



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2021

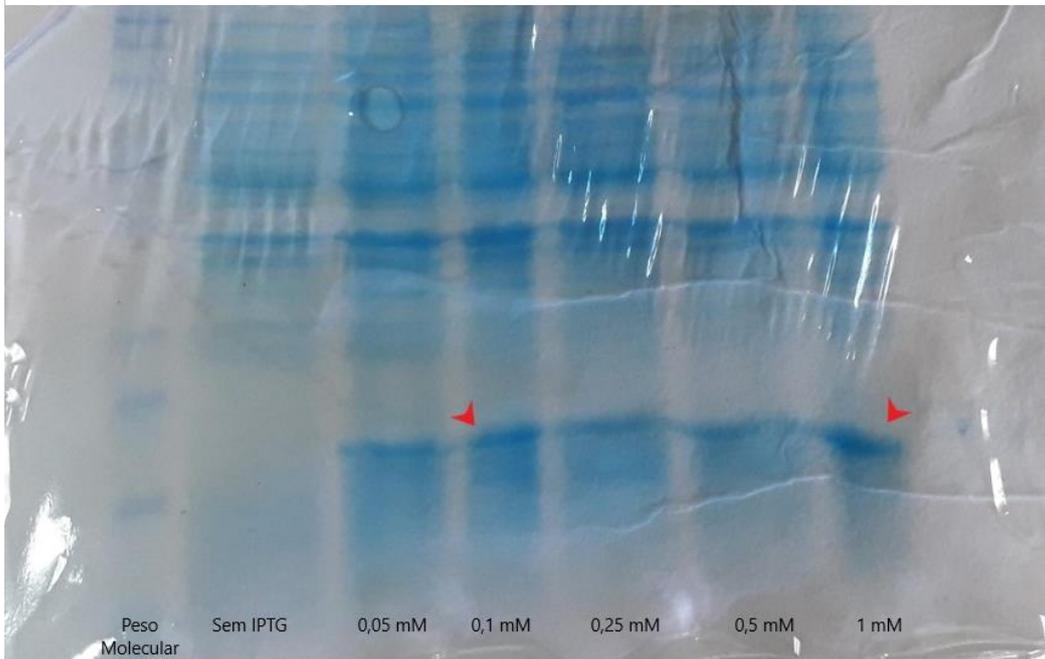
Como resultado do experimento com diferentes concentrações de IPTG para a cepa supramencionada, verificou-se uma melhor expressão da proteína GDF9 com os valores de IPTG de 0,1 mM e 0,5 mM (Figura 2) enquanto a proteína BMP15 é melhor induzida com as concentrações de 0,1 mM e 1 mM IPTG (Figura 3)

Figura 2: Gel de poliacrilamida (15%) para amostras de GDF9 induzidas com diferentes quantidades de IPTG.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2020.

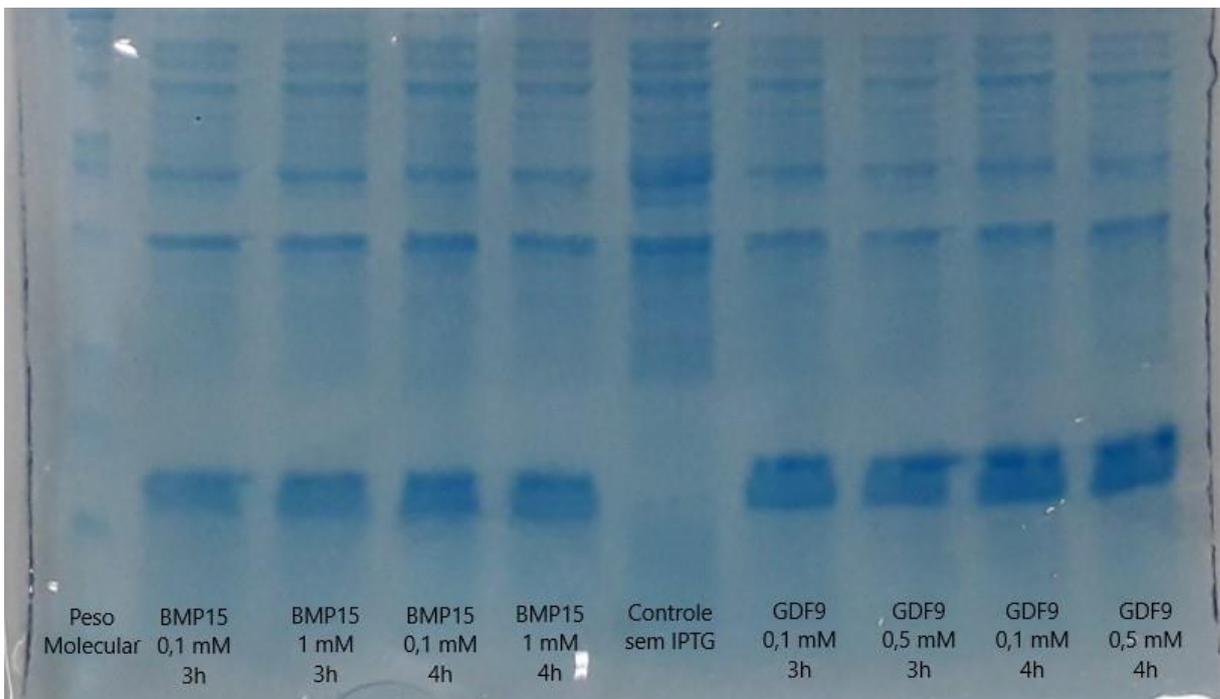
Figura 3: Gel de poliacrilamida (15%) para amostras de BMP15 induzidas com diferentes quantidades de IPTG.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2020.

Acerca dos tempos de indução para a estirpe BL21 (DE3) pLysS/E, verificou-se a melhor expressão de proteínas quando a amostra é induzida entre 3 e 4 horas não importando a quantidade de IPTG (Figura 4).

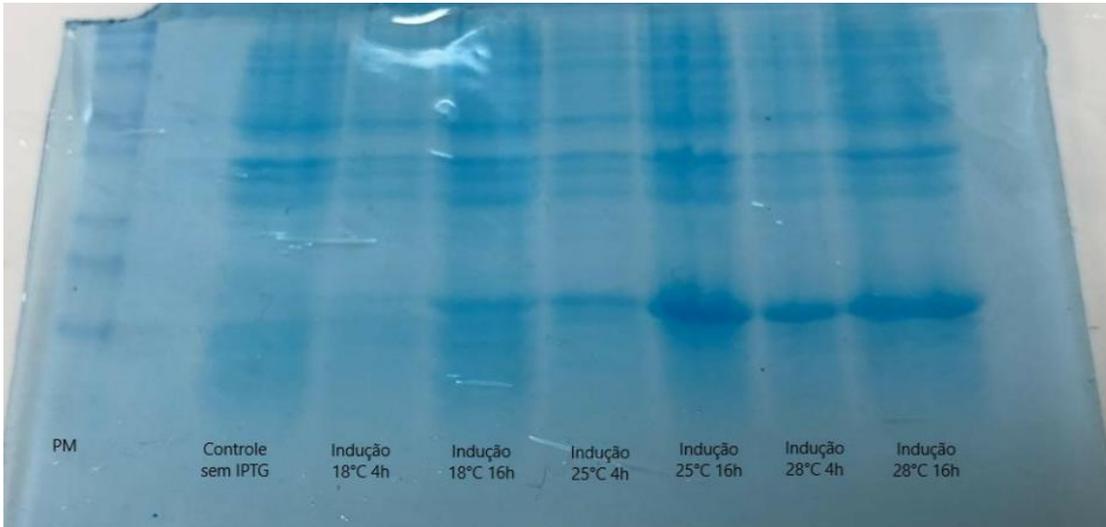
Figura 4: Gel de poliacrilamida (15%) de GDF9 e BMP15 com tempos de indução de 3 e 4 horas.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2020.

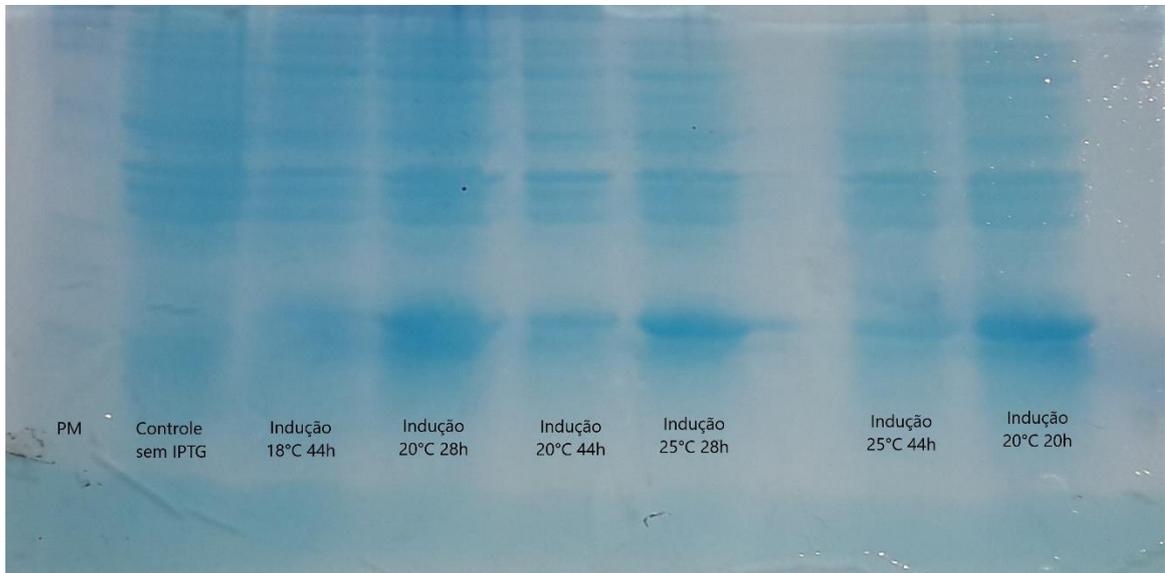
Sobre a cepa bacteriana BL21 star, em um experimento com diferentes tempos e diferentes temperaturas obteve-se como resultado uma melhor expressão da proteína GDF9 em 25°C ou 20°C no período de overnight (Figuras 5 e 6).

Figura 5: Gel de poliacrilamida (15%) para amostras de BL21 star induzidas para a produção de GDF9 sob temperaturas e tempos distintos.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2021

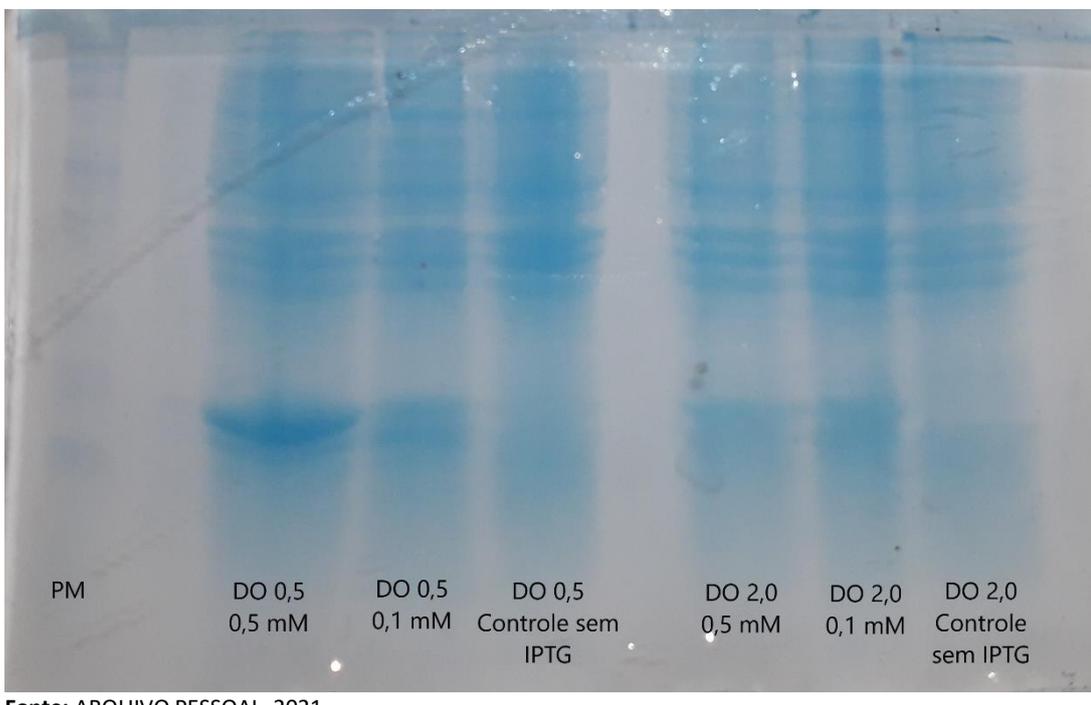
Figura 6: Gel de poliacrilamida (15%) para amostras de BL21 star induzidas para a produção de GDF9 em diferentes temperaturas e tempos.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2021.

Em um experimento com diferentes quantidades de IPTG e densidade óptica (DO), como resultado verificou-se a melhor expressão de proteínas com uma DO de 0,5 e uma quantidade de 0,5 mM de IPTG (Figura 7).

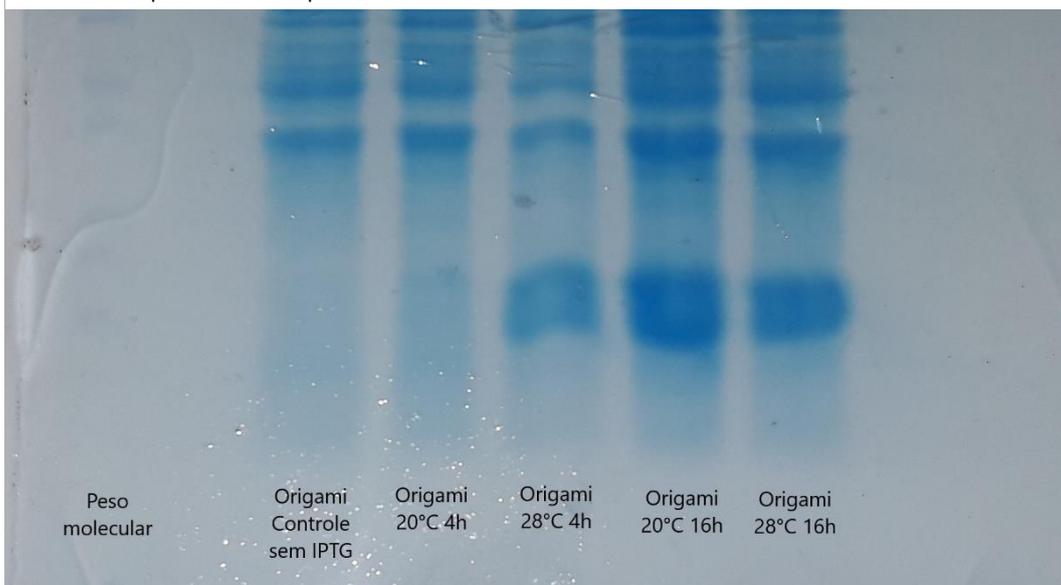
Figura 7: Gel de poliacrilamida (15%) para as amostras de BI 21 star induzidas para a produção da proteína GDF9 em diferentes concentrações de IPTG e DO.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2021.

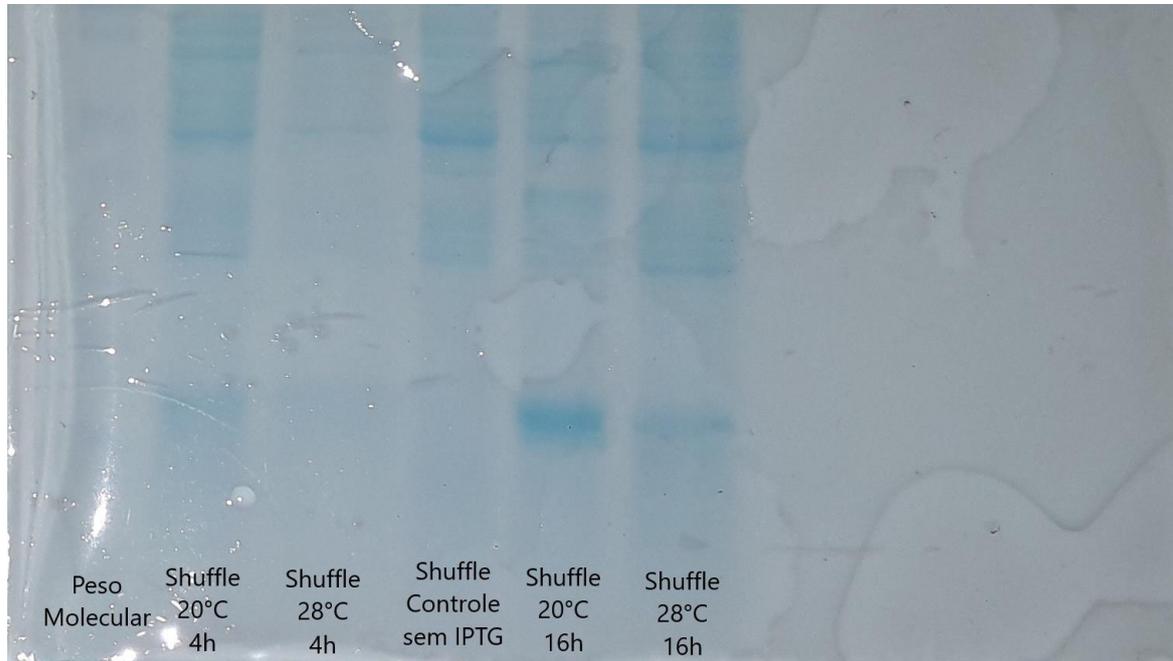
Quanto às cepas Origami e Shuffle, experimentos com diferentes temperaturas e tempos foram adotados obtendo-se como resultado a temperatura de 20°C à 16h como melhor parâmetro (Figuras 8 e 9). Neste experimento utilizou-se 0,2 mM de IPTG como concentração.

Figura 8: Gel de poliacrilamida (15%) para amostras de Origami induzidas para produção de GDF9 em diferentes temperaturas e tempos.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2021.

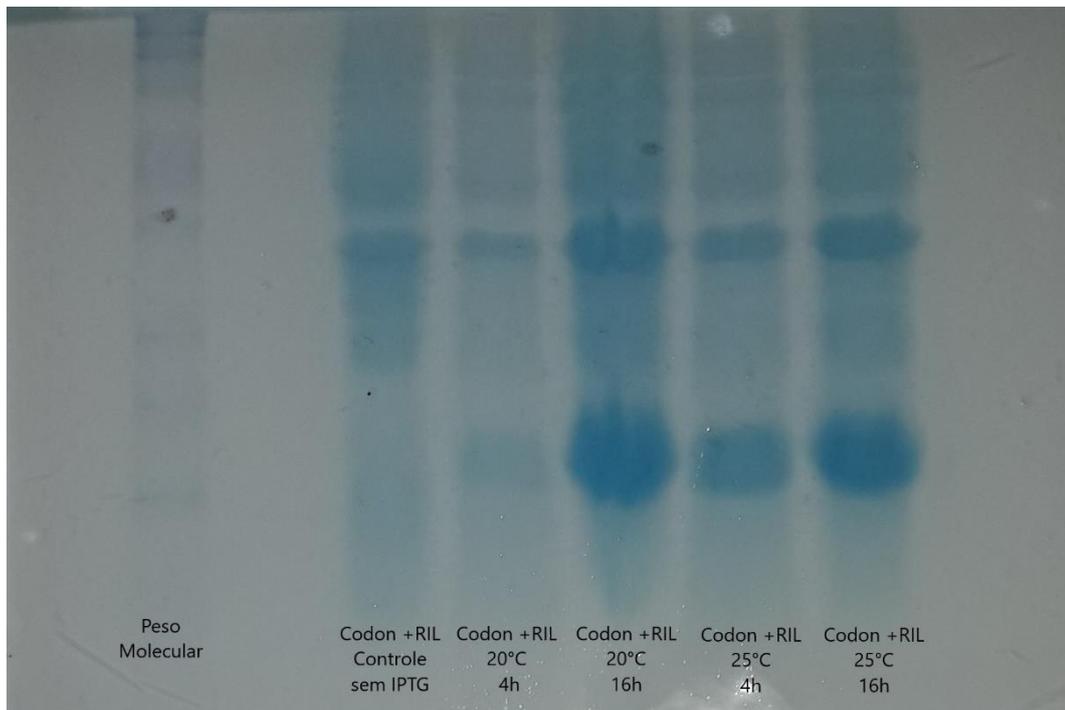
Figura 9: Gel de poliacrilamida (15%) para amostras de Shuffle induzidas para a produção de GDF9 em diferentes temperaturas e tempos.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2021.

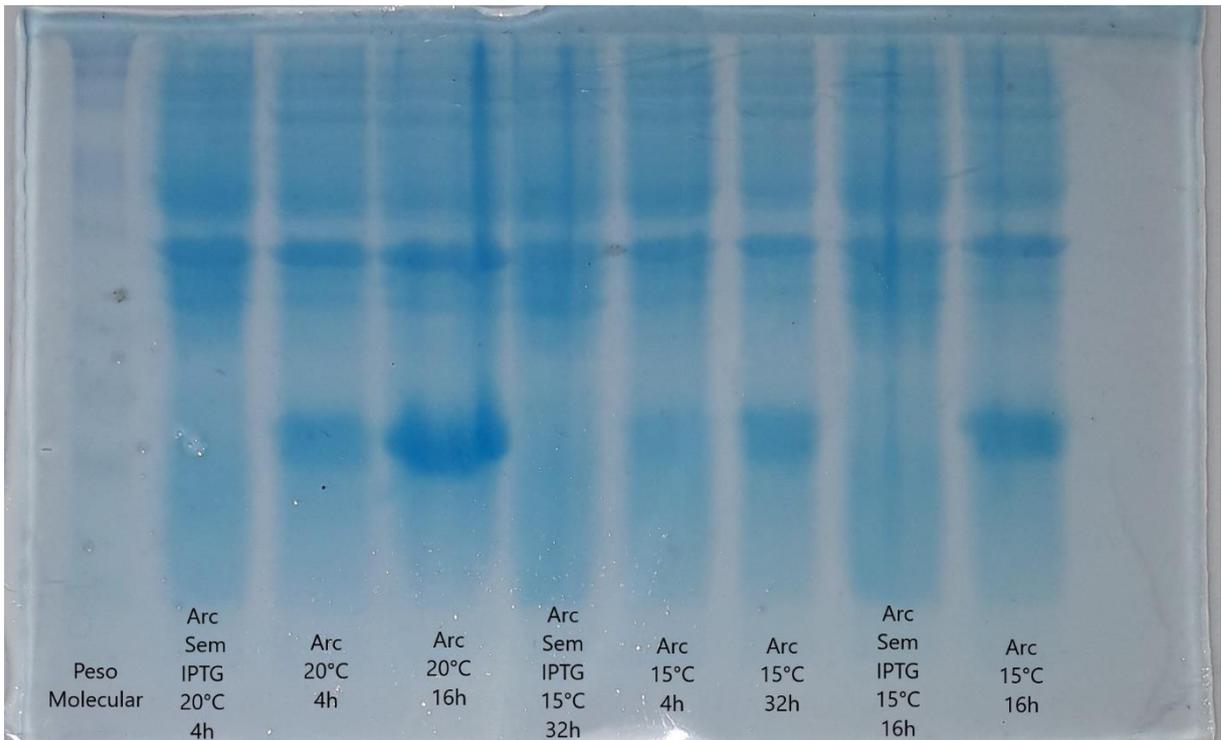
A mesma resolução supracitada foi obtida para as estirpes Codon Plus RIL e Arctic Express em um experimento sob os mesmos parâmetros supracitados (Figuras 10 e 11).

Figura 10: Gel de poliacrilamida (15%) para amostras de Codon Plus RIL induzidas para a produção de GDF9 em diferentes temperaturas e tempos.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2021.

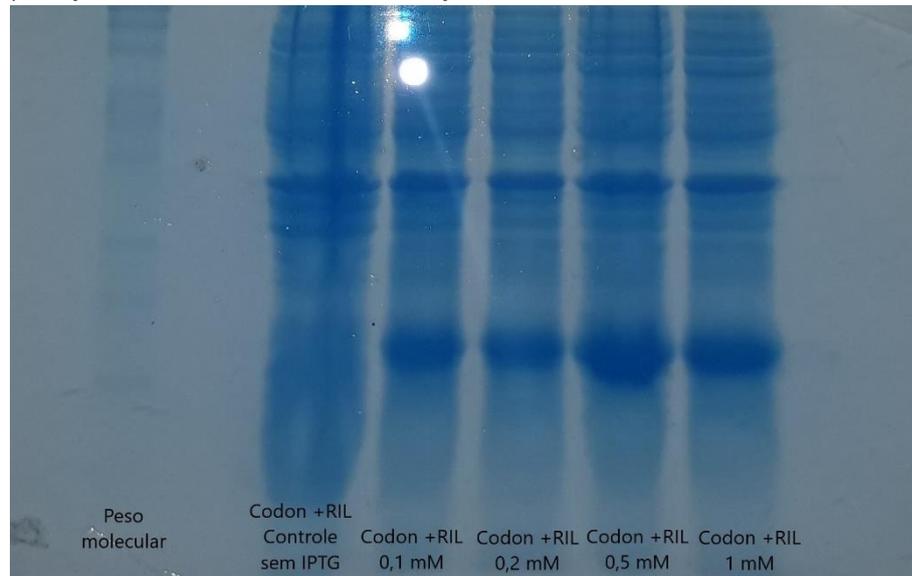
Figura 11: Gel de poliacrilamida (15%) para amostras de Arctic Express (Arc) induzidas para a produção de GDF9 em diferentes temperaturas e tempos.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2021.

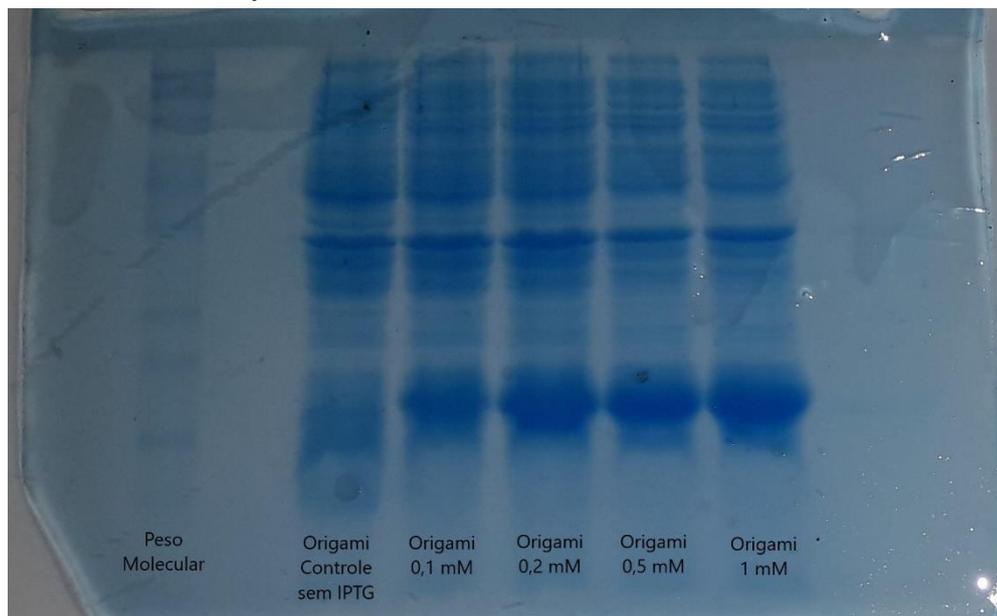
Acerca da quantidade de IPTG, foram testadas quantias de 0,1; 0,2; 0,5 e 1 mM de IPTG para as cepas Codon Plus RIL, Origami, Shuffle e Arctic Express, em que apesar dos resultados relativamente bons em todas as quantias de IPTG, a melhor expressão foi na concentração de 0,5 mM (Figuras 12, 13, 14 e 15)

Figura 12: Gel de poliacrilamida (15%) para amostras de Codon Plus RIL induzidas para a produção de GDF9 em diferentes concentrações de IPTG.



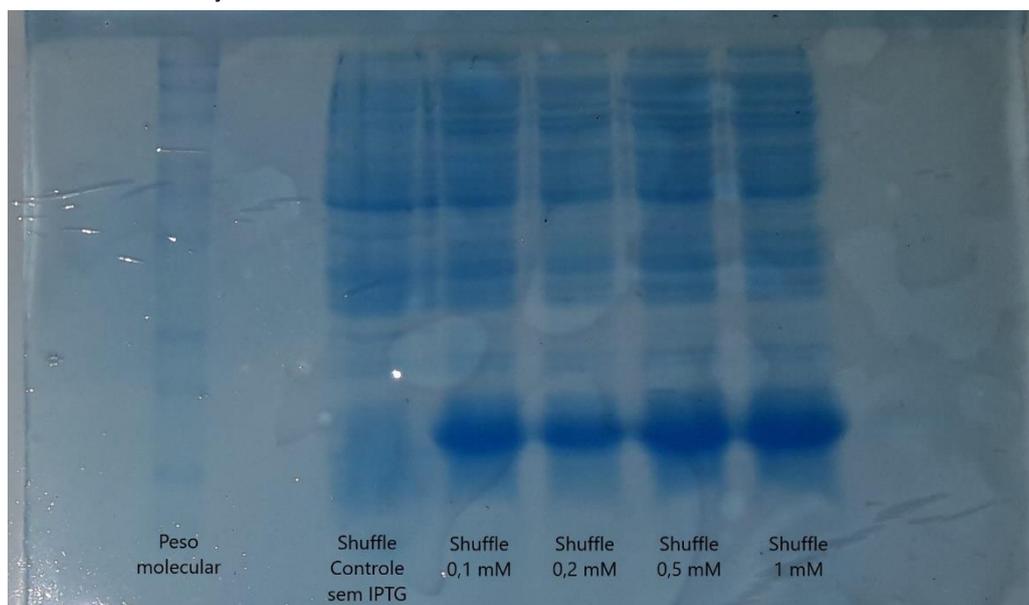
Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2021.

Figura 13: Gel de poliacrilamida (15%) para amostras de Origami induzidas para a produção de GDF9 em diferentes concentrações de IPTG.



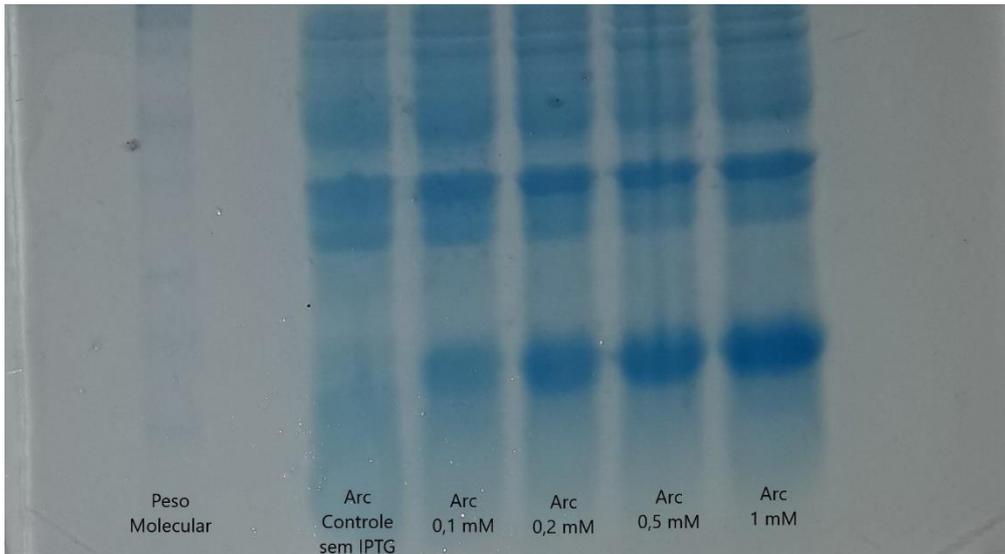
Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2021.

Figura 14: Gel de poliacrilamida (15%) para amostras de Shuffle induzidas para a produção de GDF9 em diferentes concentrações de IPTG.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2021.

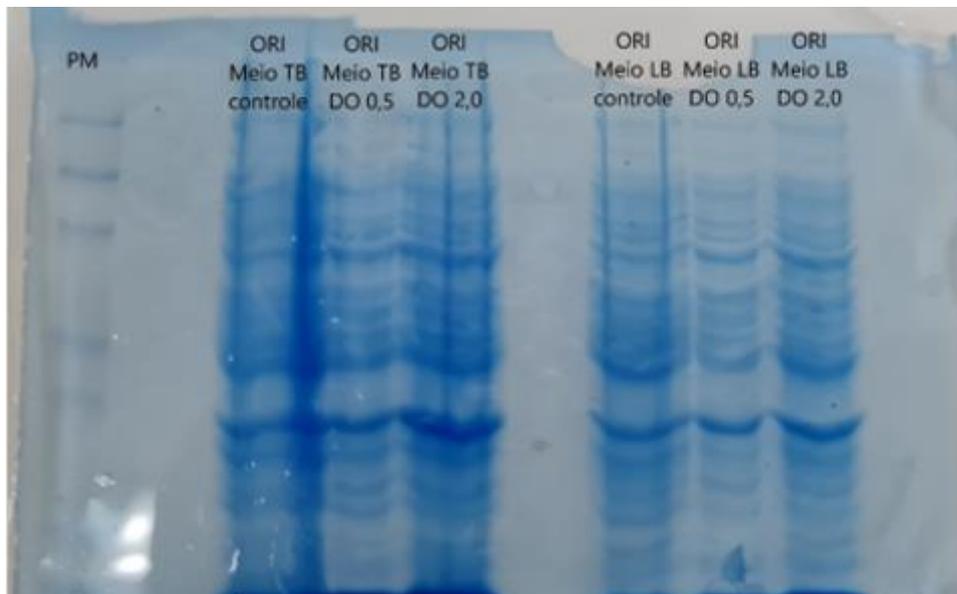
Figura 15: Gel de poliacrilamida (15%) para amostras de Arc induzidas para a produção de GDF9 em diferentes concentrações de IPTG.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2021.

Em relação a comparação entre os meios de cultura LB e TB, ambos com ampicilina (100 µg/mL), utilizou-se a cepa Origami como modelo e percebeu-se uma expressão ligeiramente melhor para as bactérias, quando expressas no meio TB não importando a densidade óptica utilizada (Figura 16).

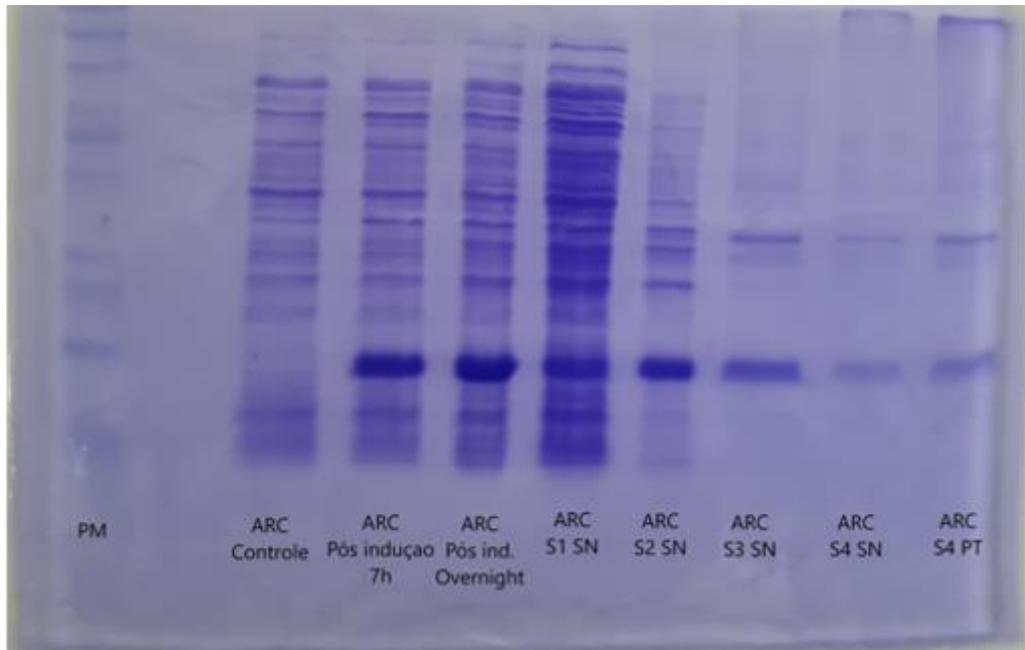
Figura 16: Gel de poliacrilamida (15%) para amostras de Origami induzidas para a produção de GDF9 em diferentes meios de cultura e densidades ópticas.



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2022.

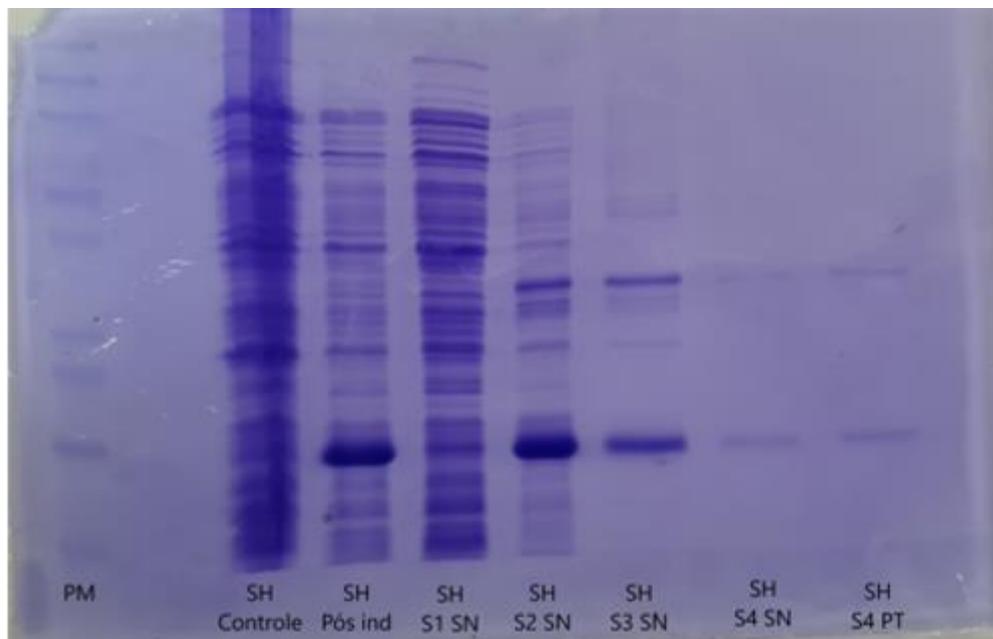
Acerca da solubilidade das proteínas expressas, após as alterações de protocolo, verificou-se uma melhora nesse parâmetro em que após 4 ciclos de sonicação, as amostras de bactérias Arctic Express, Origami e Shuffle testadas até o momento mostraram que a proteína alvo não se agregou completamente em pellets (Figura 17, 18 e 19)

Figura 17: Gel de poliacrilamida (17,5%) para amostras de Arctic Express induzidas para a produção de GDF9 e sonicadas múltiplas vezes



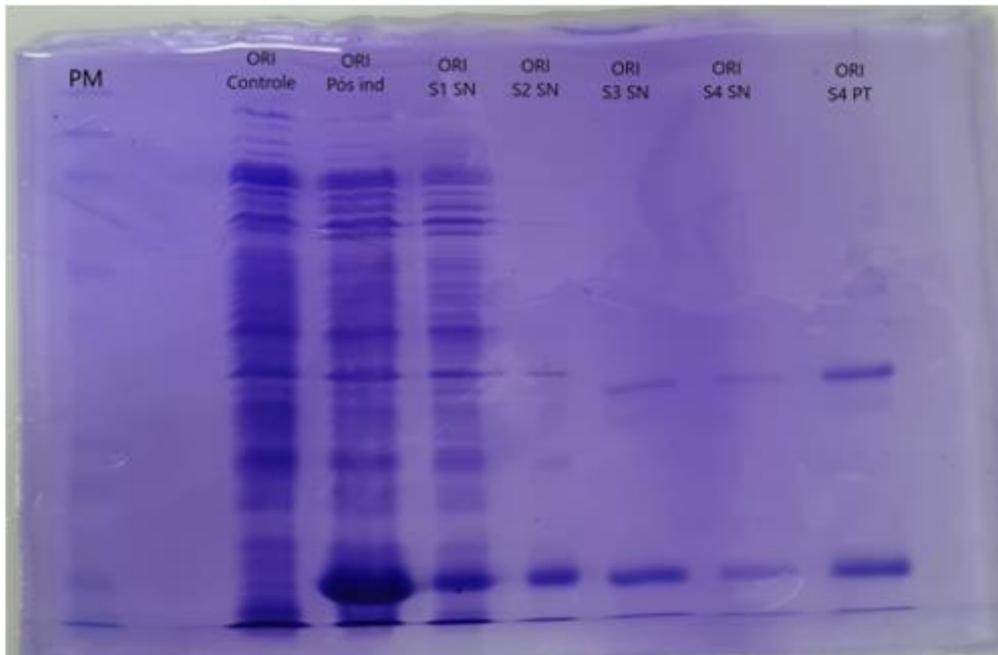
Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2022.

Figura 18: Gel de poliacrilamida (17,5%) para amostras de cepa Shuffle induzidas para a produção de GDF9 e sonicadas múltiplas vezes



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2022.

Figura 19: Gel de poliacrilamida (17,5%) para amostras de cepa Origami induzidas para a produção de GDF9 e sonicadas múltiplas vezes



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2022.

5 DISCUSSÃO

De acordo com a literatura, pesquisadores podem depara-se com algumas problemáticas supramencionadas durante a expressão de proteínas heterólogas em *E. coli*, dentre essas a formação de agregados proteínicos insolúveis que se sedimentam durante a centrifugação da amostra em pelotas (pellets) visíveis bem como foi verificado com este experimento (5,24).

Diante da problemática citada, novas abordagens no experimento foram exploradas seguindo as 5 estratégias propostas por Gopal e Kumar (5) a fim de reduzir a formação de corpos de inclusão. Todavia, deve-se salientar que não há uma estratégia universal para todos os casos de expressão proteica. São necessárias diversas observações empíricas para cada proteína bem como cepa utilizada (52).

Perante a Gopal e Kumar (5), a solubilidade da proteína recombinante é aumentada com um tempo de indução maior sob temperaturas mais baixas bem como uma quantidade diminuída de IPTG. Aliado a tal dado, Gutiérrez-González (52) cita que a expressão de proteínas insolúveis se correlaciona com temperaturas maiores e um menor tempo provavelmente devido a necessidade que a célula apresenta de acumular a proteína a fim de evitar danos bacterianos. Embora não se tenha feito experimentos acerca da solubilidade das proteínas, a alteração no tempo de indução bem como na temperatura levou a uma melhor expressão bem como relatado na literatura com exceção da cepa Arctic Express.

Segundo Vincenti (53), a estirpe Arctic Express foi projetada para um melhor processamento em baixas temperaturas com altas atividades de redobramento de proteínas em temperaturas entre 4 e 12°C, todavia no experimento realizado tal linhagem apresentou uma melhor expressão de proteínas em uma temperatura de 20°C e como não foram realizados, até o momento, experimentos acerca da solubilidade dessas proteínas não é possível confirmar que esse fato está de acordo com o relatado pela bibliografia. Devido a disponibilidade de equipamentos do laboratório, a menor temperatura que a bactéria Arctic Express conseguiu ser testada foi à 15°C.

Perante a literatura, a expressão de proteínas com *E. coli* utiliza normalmente a quantidade de 1 mM de IPTG, todavia as características das proteínas recombinantes desejadas podem influenciar de modo considerável na quantidade de IPTG que deverá ser utilizada para uma boa indução em que quantidades entre 0,01 mM e 0,1 mM podem ser

melhores em uma indução no âmbito de minimizar problemas com a insolubilidade das proteínas expressas (54). Para a estirpe BL21 (DE3) pLysS/E como o indicado na literatura, manteve-se com uma boa expressão para ambas proteínas em 0,1 mM.

Já para a linhagem BL21 star tal concentração de IPTG não foi o suficiente sendo o melhor resultado com a concentração de 0,5 mM. Segundo o experimento realizado por Einsfeldt (55) de expressão de proteínas ClpP em cepas BL21 star, a concentração de 0,1 mM de IPTG ou abaixo deste valor deve ser usada a fim de obter uma baixa segregação e manter a estabilidade do plasmídeo. Enquanto para o experimento realizado por Di, Ma e Wang (56) a expressão de proinsulina em BL21 star apresenta como parâmetro encontrado a concentração de 2 mM de IPTG. Exemplificando o dito em outrora que há uma ausência de uma estratégia universal para todos os casos de expressão polipeptídica (52).

De acordo com Ren, Ke e Berkmen (57) a expressão do plasmídeo para estirpes Shuffle normalmente ocorre com uma concentração de 0,1 mM fato exemplificado com os resultados em que tal cepa apresentou uma indução relativamente boa para todas as concentrações de IPTG a partir de 0,1 mM.

Para a linhagem Origami, em um estudo realizado por Castro-Martínez (58) a concentração de 0,3 mM de IPTG foi a ideal para a expressão da proteína modificada amarantina sendo um resultado bem próximo do adotado como melhor neste trabalho.

A estirpe Codon Plus RIL foi utilizada em um estudo de expressão proteica para a proteína doce Brazzein e, perante a tal estudo, com uma temperatura de 25°C pelo período de overnight a concentração de 0,5 mM de IPTG é a ideal para a expressão da proteína, sendo um resultado bem semelhante ao que foi encontrado para a produção de GDF9 nessa cepa (59).

Em um experimento realizado por Li et al (60) com a utilização da cepa Arctic Express na produção de proteína Bm30K-19G1 utilizou-se uma concentração final de IPTG de 0.5 mM apresentando bons resultados, semelhante ao encontrado nesta pesquisa, todavia, segundo tal artigo, com a técnica de SDS-PAGE analisou-se que as proteínas expressas estavam em sua maioria em corpos de inclusão e não é relatado a temperatura de indução utilizada para tal cepa bacteriana. Em comparação a outro estudo realizado por Belval et al (61) com a estirpe Arctic Express, no qual a bactéria foi induzida para a produção de uma endoglucanase com a adição de 1 mM de IPTG à 10 °C pelo período de 24h, é possível verificar um resultado diferente do alcançado. Tal fato pode ter sido influenciado pela eleição de uma temperatura

distinta entre os experimentos em que perante a experimentação feita por Mühlmann et al (62) concentrações mais baixas de IPTG são mais vantajosas para induções em temperaturas mais elevadas.

O meio TB foi desenvolvido em 1987 e, apesar do meio LB ser o mais utilizado em muitos experimentos laboratoriais, tal meio de cultura aumenta o rendimento do plasmídeo, estendendo a fase exponencial de crescimento da bactéria *E. coli*. Tal fato é demonstrado no experimento de Kram e Finkel (63) o qual testou diferentes soluções líquidas de cultura bacteriana e o seu efeito no crescimento e sobrevivência na cepa *E. Coli* K-12 linhagem PFM2. De acordo com tal pesquisa, quando a bactéria desejada está crescendo aerobicamente no meio LB, a cultura torna-se mais alcalina durante a fase exponencial de crescimento devido ao metabolismo de aminoácidos o que aumenta o pH da solução durante a fase estacionária da expansão bacteriana e tal efeito contribui para a morte celular. Já no meio TB esse processo de alcalinização e conseqüentemente a entrada na fase de morte celular é mais lento provavelmente pela presença de glicerol como uma fonte de carbono cujo metabolismo libera ácido no ambiente além da presença de fosfato de potássio KH_2PO_4 que naturalmente tampona este meio.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por fim, apesar de uma boa metodologia para melhor expressão de PTNs na porção solúvel dos lisados bacterianos esteja quase desenvolvida em sua plenitude, ainda é necessário a realização de mais pesquisas com as diferentes cepas bacterianas propostas neste trabalho a fim de purificar as proteínas alvo por cromatografia de troca iônica e assim dar continuidade a pesquisa em ensaios de esterilização não invasiva de fêmeas de capivaras, servindo como controle populacional dessa espécie.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hosoe M, Kaneyama K, Ushizawa K, Hayashi K, Takahashi T. Quantitative analysis of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth differentiation factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9(33):1–8.
2. Pinto GRM. Contagem de fezes como índice de abundância de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*). Piracicaba. Universidade de São Paulo; 2003.
3. Tomazzoni AC. Ecologia da capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*, Linnaeus 1766) (Mammalia, Rodentia) na Reserva Biológica do Lami, sul do Brasil [Internet]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003. Available from: <http://hdl.handle.net/10183/3176>
4. Ferraz KMPM de B, Lechevalier M-A, Couto HTZ do, Verdade LM. Damage caused by capybaras in a corn field. *Sci Agric*. 2003;60(1):191–4.
5. Gopal GJ, Kumar A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J*. 2013;32(6):419–25.
6. Khan S, Ullah MW, Siddique R, Nabi G, Manan S, Yousaf M, et al. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *Int J Genomics*. 2016;2016:1–14.
7. Chen R. Bacterial expression systems for recombinant protein production : *E. coli* and beyond. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2012;30(5):1102–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.013>
8. Gupta V, Sengupta M, Prakash J, Tripathy BC. Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins. *Basic Appl Asp Biotechnol* [Internet]. 2016;23:77–101. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7120688/>
9. Johnson IS. Human Insulin from Recombinant DNA Technology. *Science* (80-). 1983;219(4585):632–7.
10. Ladisch MR, Kohlmann KL. Recombinant Human Insulin Analogues. *Biotechnol Prog*. 1992;8:469–78.
11. Razaee M, Zarkesh-Esfahani SH. Optimization of Production of Recombinant Human Growth Hormone in *Escherichia coli*. *J Res Med Sci*. 2012;17(7):681–5.
12. Wotton D, Massague J. NEW EMBO MEMBER ' S REVIEW Transcriptional control by the TGF- β / Smad signaling system. *EMBO J*. 2000;19(8):1745–54.
13. Knight PG, Glister C. Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci*. 2003;78(3–4):165–83.
14. Knight PG, Glister C. Focus on TGF- β Signaling TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 2006;132:191–206.
15. Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JJ, Mizel DE, et al. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol*. 1999;1(September):260–6.
16. McNatty KP, Moore LG, Hudson NL, Quirke LD, Lawrence SB, Reader K, et al. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: A new paradigm in reproductive biology. *Reproduction*. 2004;128(4):379–86.
17. Juengel JL, McNatty KP. The role of proteins of the transforming growth factor- β superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update*. 2005;11(2):143–60.
18. Castro FC De, Cruz MHC, Leal CL V. Role of Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 in Ovarian Function and Their Importance in Mammalian

- Female Fertility — A Review. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 2016;29(8):1065–74.
19. Paulini F. EXPRESSÃO DO GROWTH AND DIFFERENTIATION FACTOR 9 (GDF9) E BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 15(BMP15) IN VITRO E SEU EFEITO NO PROCESSO DE LUTEINIZAÇÃO EM CÉLULAS DA GRANULOSA BOVINAS. Vol. 9, Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. 2010. 1–150 p.
 20. Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MPE, Juengel JL, Jokiranta TS, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet.* 2000;25(3):279–83.
 21. Paulini F, Melo EO. The Role of Oocyte-Secreted Factors GDF9 and BMP15 in Follicular Development and Oogenesis. *Reprod Domest Anim.* 2011;46(2):354–61.
 22. Lan Z, Gu P, Xu X, Jackson KJ, Demayo FJ, Malley BWO, et al. GCNF-dependent repression of BMP-15 and GDF-9 mediates gamete regulation of female fertility. *EMBO J.* 2003;22(16):4070–81.
 23. McNatty KP, Hudson NL, Whiting L, Reader KL, Lun S, Western A, et al. The effects of immunizing sheep with different BMP15 or GDF9 peptide sequences on ovarian follicular activity and ovulation rate. *Biol Reprod.* 2007;76(4):552–60.
 24. Kane JF, Hartley DL. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 1988;6(5):95–101.
 25. Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol.* 2004;22(11):1399–407.
 26. Choi JH, Keum KC, Lee SY. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem Eng Sci.* 2006;61(3):876–85.
 27. Ramón A, Señoralé-POSE M, Marín M. Inclusion bodies : not that bad . . . *Front Microbiol.* 2014;5(February):2010–5.
 28. Laskowska E, Wawrzynów A, Taylor A. IbpA and IbpB, the new heat-shock proteins, bind to endogenous *Escherichia coli* proteins aggregated intracellularly by heat shock. *Biochimie.* 1996;78(2):117–22.
 29. Jürgen B, Breitenstein A, Urlacher V, Büttner K, Lin H, Hecker M, et al. Quality control of inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2010;9(41):1–13.
 30. LeThanh H, Neubauer P, Hoffmann F. The small heat-shock proteins IbpA and IpbB reduce the stress load of recombinant *Escherichia coli* and delay degradation of inclusion bodies. *Microb Cell Fact.* 2005;4:1–12.
 31. Ryan BJ, Henahan GT. Overview of approaches to preventing and avoiding proteolysis during expression and purification of proteins. *Curr Protoc Protein Sci.* 2013;(SUPPL.71):1–7.
 32. Marston FA. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem J.* 1986;240(1):1–12.
 33. Moens MS, Vanderleyden J. Glycoproteins in prokaryotes. *Arch Microbiol.* 1997;168:169–75.
 34. Solá RJ, Rodríguez-Martínez JA, Griebenow K. Modulation of protein biophysical properties by chemical glycosylation: Biochemical insights and biomedical implications. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(16):2133–52.
 35. Vaishnav P, Demain AL. Industrial Biotechnology, (overview). *Encycl Microbiol.* 2009;335–48.
 36. Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals.

- Reproduction. 2001;122(6):829–38.
37. Kane JF. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*. 1995;6(5):494–500.
 38. Hershberg R, Petrov DA. Selection on codon bias. *Annu Rev Genet*. 2008;42:287–99.
 39. McDonald KA, Davis C. Heterologous Protein Expression [Internet]. Second Edi. Vol. 1, *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier B.V.; 2011. 441–449 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00114-8>
 40. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol*. 2004;22(7):346–53.
 41. Robinson M, Lilley R, Little S, Emtage JS, G. Y, Stephens P, et al. Codon usage can affect efficiency of translation of genes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 1984;12(17):6663–71.
 42. Engelbrecht V, Happe T. [FeFe] -hydrogenases from green algae. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. 1st ed. Elsevier Inc.; 2018. p. 203–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mie.2018.10.004>
 43. Hausjell J, Kutscha R, Gesson JD, Reinisch D, Spadiut O. The Effects of Lactose Induction on a Plasmid-Free *E. coli* T7 Expression System. *Bioengineering*. 2020;7(8):1–12.
 44. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* : advances and challenges. *Front Microbiol*. 2014;5(April):1–17.
 45. Doherty AJ, Connolly BA, Worrall AF. Overproduction of the toxic protein , bovine pancreatic DNaseI , in *Escherichia coli* using a tightly controlled T7-promoter-based vector. *Gene*. 1993;136:337–40.
 46. Dong H, Nilsson L, Kurland CG. Gratuitous Overexpression of Genes in *Escherichia coli* Leads to Growth Inhibition and Ribosome Destruction. *J Bacteriol*. 1995;177(6):1497–504.
 47. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 1990;96(1):23–8.
 48. BEROVIČ M. Sterilization in Biotechnology. In: *Comprehensive Biotechnology*. 2 ed. United States: Elsevier; 2011. p. 135–50.
 49. Chung DDL. Cement-Matrix Composites. In: *Carbon Composites*. 2 ed. United States: Elsevier Inc.; 2017. p. 333–86.
 50. Nelson DL, Cox MM. Estrutura Tridimensional das Proteínas. In: *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 7 ed. Artmed; 2019. p. 115–50.
 51. Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
 52. Gutiérrez-gonzález M, Farías C, Tello S, Pérez-etcheverry D, Romero A, Zúñiga R, et al. Optimization of culture conditions for the expression of three different insoluble proteins in *Escherichia coli*. *Nat Sci Reports*. 2019;9(16850):1–11.
 53. Vincenti S, Mariani M, Croce J, Faillace E, de Caraffa VBB, Berti L, et al. Optimizing the production of recombinant hydroperoxide lyase in *Escherichia coli* using statistical design. *Catalysts*. 2021;11(2):1–18.
 54. Donovan RS, Robinson CW, Glick BR. Review : Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *J Ind Microbiol*. 1996;16:145–54.
 55. Einsfeldt K, Severo Júnior JB, Corrêa Argondizzo AP, Medeiros MA, Alves TLM, Almeida RV, et al. Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in

- Escherichia coli*: Study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability. *Vaccine* [Internet]. 2011;29(41):7136–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.073>
56. Di ZX, Ma JZ, Wang YG. Expression of a fusion protein of human proinsulin with glutathione-S-transferase in *Escherichia coli*. *Adv Mater Res*. 2014;998–999:248–51.
 57. Ren G, Ke N, Berkmen M. Use of the SHuffle strains in production of proteins. *Curr Protoc Protein Sci*. 2016;2016:5.26.1-5.26.21.
 58. Castro-Martínez C, Luna-Suárez S, Paredes-López O. Overexpression of a modified protein from amaranth seed in *Escherichia coli* and effect of environmental conditions on the protein expression. *J Biotechnol* [Internet]. 2012;158(1–2):59–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.12.012>
 59. Assadi-Porter F, Patry S, Markley JL. Efficient and rapid protein expression and purification of small high disulfide containing sweet protein brazzein in *E. coli*. *Protein Expr Purif*. 2008;58(2):263–8.
 60. Li R, Hu C, Shi Y, Geng T, Lv D, Gao K, et al. Silkworm storage protein Bm30K-19G1 has a certain antifungal effects on *Beauveria bassiana*. *J Invertebr Pathol* [Internet]. 2019;163(December 2018):34–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.02.008>
 61. Belval L, Marquette A, Mestre P, Piron MC, Demangeat G, Merdinoglu D, et al. A fast and simple method to eliminate Cpn60 from functional recombinant proteins produced by *E. coli* Arctic Express. *Protein Expr Purif*. 2015;109:29–34.
 62. Mühlmann M, Forsten E, Noack S, Büchs J. Optimizing recombinant protein expression via automated induction profiling in microtiter plates at different temperatures. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2017;16(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0832-4>
 63. Kram KE, Finkel SE. Rich medium composition affects *Escherichia coli* survival, glycation, and mutation frequency during long-term batch culture. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(13):4442–50.