

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

FABIANA DOS SANTOS RANDO

Análise da expressão da proteína de reparo kin17 em células em cultura *Bm5* e em tecidos larvais de *Bombyx mori* L.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO DE 2013

FABIANA DOS SANTOS RANDO

Análise da expressão da proteína de reparo kin17 em células em cultura *Bm5* e em tecidos larvais de *Bombyx mori* L.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora Prof^a Dr^a Maria Aparecida Fernandez.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO DE 2013

Aos meus pais, Amilton Rando e Nilsa dos Santos Rando, por sempre estar ao meu lado, indicando o caminho certo a seguir, e principalmente pelo apoio incondicional dado às minhas escolhas. Vocês são muito importantes na minha vida!

Ao meu irmão querido, Igor dos Santos Rando, que dividiu sua vida comigo nos momentos de alegrias e tristezas.

A toda minha família e parentes que sempre estiveram presentes.

Aos meus outros grandes amigos que fizeram parte ou ainda estão presentes na minha vida, trocando experiências, enfrentando a vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nos apóia e dá forças para prosseguirmos em frente e sem o qual nada teria conquistado.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade.

Ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa – COMCAP/UEM.

Às instituições financeiras Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, (CNPq), Fundação Araucária e Unidade Gestora do Funda Paraná, SETI/UGF, pelo apoio financeiro aos nossos projetos.

À professora doutora Maria Aparecida Fernandez, por ter aberto as portas do seu laboratório tão gentilmente, proporcionando oportunidades em meu crescimento acadêmico e também por ser esse exemplo de dedicação ao trabalho e às pessoas.

Aos meus grandes amigos e companheiros de Laboratório, Quirino Alves de Lima Neto, Douglas Vinícius Bassalobre Freitas e José Renato Pattaro, pelas contribuições tão importantes, seja como pesquisadores, seja como amigos.

Aos meus queridos parceiros de Laboratório, Anelise, Kátya, Francisco, Vanessa, Clarissa, Thaís, Roxelle, Cláudia, Verônica, Grazielle, Naiara, Rafaela e Lívia. Obrigada por toda a ajuda, apoio e momentos juntos.

Ao Valmir Peron, Fábio Rogério Rosado e à Marli Licero Schuete Silva, pela dedicada assistência técnica, sempre cuidando do nosso laboratório com muito bom humor.

Às professoras Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro e Rose Meire Costa Brancalhão, da Universidade Estadual do Centro Oeste (UNIOESTE), campus Cascavel, pelo auxílio durante o estágio realizado no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia do CENARGEM/Brasília, sob a coordenação da pesquisadora Maria Elita Batista de Castro.

Aos membros da Banca Examinadora, professor doutor Flavio Augusto Vicente Seixas e professor doutor José Luís da Conceição Silva, pelo aceite para participar da Banca e pelas grandes contribuições a este trabalho.

BIOGRAFIA

FABIANA DOS SANTOS RANDO filha de Amilton Rando e Nilsa dos Santos Rando, nasceu em dois de setembro de 1987, na cidade de Votuporanga, estado de São Paulo.

Em dezembro de 2002, concluiu o Ensino Fundamental na Dinâmica-Escola de Educação Básica de Votuporanga, na cidade de Votuporanga, estado do São Paulo, mesma Instituição de Ensino em que, em dezembro de 2005, concluiu o Ensino Médio.

Ingressou no Curso de Ciências Biológicas, em março de 2007, na Universidade Estadual de Maringá, na cidade de Maringá, estado do Paraná, obtendo o título de Bióloga em janeiro de 2011.

Participou de projetos de pesquisa no laboratório de Organização Funcional do Núcleo sob a orientação da professora doutora Maria Aparecida Fernandez.

Em março de 2011, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), da Universidade Estadual de Maringá – UEM, em Maringá, estado do Paraná, Brasil.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	Erro! Indicador não definido.
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. <i>Bombyx mori</i>	3
2.1.1. Classificação	3
2.1.1.1. Classificação por origem.....	4
2.1.1.2. Classificação por voltinismo.....	5
2.1.1.3. Classificação por número de ecdises ou de mudas.....	5
2.1.2. Origem	6
2.1.3. Sericicultura.....	7
2.1.4. Patógenos	9
2.1.5. Importância.....	10
2.2. Proteína de reparo kin17	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Materiais Biológicos.....	16
3.1.1. Lagartas	16
3.1.2. Células	16
3.2. Dissecção e preparação das amostras.....	17
3.3. Inoculação de células <i>Bm5</i> com BmNPV.....	17
3.4. Gel de poliacrilamida	17
3.5. Western blot.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Detecção da proteína kin17 em tecidos larvais de <i>Bombyx mori</i>	19
4.2. Detecção da proteína kin17 em células <i>Bm5</i> infectadas pelo BmNPV	20
4.3. Estudo de análises de sequência protéica de kin17 de hamster contra a sequência de disco imaginal de <i>B. mori</i>	21
5. CONCLUSÕES	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	25

RESUMO

RANDO, Fabiana, Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2013. **Análise da expressão da proteína de reparo kin17 em células em cultura *Bm5* e em tecidos larvais de *Bombyx mori* L.** Professora orientadora: Maria Aparecida Fernandez. Professores conselheiros: Ana Silvia Lapenta e Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki.

Bombyx mori (Linnaeus, 1758), popularmente conhecido como bicho-da-seda, é um inseto de importância econômica para a produção de seda e também é o segundo inseto mais utilizado como organismo modelo para estudos biológicos. O estresse pela infecção, causados por vírus e bactérias, é um dos fatores-chaves para a queda da produção. A proteína de reparo kin17 é uma importante proteína associada ao estresse celular, replicação do DNA e processamento de RNAs. O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão da proteína kin17 em tecidos larvais do 5º instar de *B. mori*, incluindo glândulas sericígenas, corpo gorduroso, ovário, testículo, túbulo de Malpighi e sistema nervoso. Também foram analisados extratos proteicos de células em cultura de *B. mori*, linhagem de *Bm5*, em diferentes períodos (0, 12, 24 e 48 horas), após a infecção pelo baculovirus BmNPV. As amostras foram extraídas de cada tecido e extrato celular e analisadas por meio da técnica de *western blotting*, utilizando anticorpos policlonais mono-específicos contra a kin17 de humanos. Os resultados mostraram a detecção de uma banda de aproximadamente 47kDa em todos os tecidos, exceto em glândulas sericígenas. Esta banda aparece com forte expressão nas amostras de corpo gorduroso e testículo. Surpreendentemente, é observado também uma banda de aproximadamente 40kDa, mais expressa em túbulo de Malpighi, sistema nervoso e corpo gorduroso. Nas amostras extraídas de cultura de células controle e infectadas, também foram detectadas duas frações protéicas, com os mesmos pesos moleculares encontrados em tecido. Assim, foi possível a detecção da kin17 nos tecidos e no extrato proteico de *B. mori* e ambos apresentam duas isoformas. Este trabalho mostra pela primeira vez as duas isoformas da proteína de reparo kin17 em células *Bm5* e tecidos larvais de *B. mori*. A detecção de duas isoformas da kin17 em *B. mori* oferece uma nova perspectiva na compreensão do papel celular desempenhado por essa proteína.

Palavras-chave: *Bombyx mori*; Células *Bm5*; kin17.

ABSTRACT

RANDO, Fabiana, Universidade Estadual de Maringá, february 2013. **Kin17 repair protein expression analysis on *Bm5* culture cells and larval tissues of the *Bombyx mori* L.** Adviser: Maria Aparecida Fernandez. Committee Members: Ana Silvia Lapenta and Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki

Bombyx mori (Linnaeus, 1758) popularly known as silkworm silk, is an insect of great economic importance in the silk production and it is also the second organism used as a model organism for molecular studies. Environmental stress that causes viral or bacterial infection is one of the key factors in production decay. The repair kin17 protein is a major protein associated with cellular stress, DNA replication and RNA processing. In this study, our aim was to detect kin17 at 5th instar larval tissues from *B. mori*, including silk gland, fat body, ovaries, testicles, Malpighian tubules and nervous system. Protein extracts were also analyzed for cell culture of *B. mori*, lineage of *Bm5*, infected at different periods (0, 12, 24 and 48 hours) with the baculovirus BmNPV. Samples were extracted for each tissue and then analyzed through western blotting protocol using monoclonal antibodies against human kin17. The results showed an expected ~47kDa band on all tissues, except for the silk gland samples. The band was remarkably strong for the fat body and testicle samples. Surprisingly, an additional ~40kDa band was detected, being more expressive in the Malpighian tubules, nervous system and fat body. In samples extracted from infected and control cell culture showed, also, two fractions with the same molecular weight observed in larval tissues. Perhaps, the lower mass protein might represent an unknown isoform of kin17 in *B. mori*. In conclusion, the detection of the two kin17 isoforms offers new perspectives in the understanding of the cellular role of this protein.

Keywords: *Bombyx mori*; *Bm5* culture cells; kin17.

1. INTRODUÇÃO

A replicação do DNA é um fenômeno complexo que pode envolver milhares de origens de replicação, de tal forma que ainda hoje não é claro como 3×10^9 pb, em uma célula humana típica, são replicados com alto grau de fidelidade e em um espaço de tempo relativamente tão curto. Devido a esta complexidade, é bem provável que o metabolismo do DNA seja realizado por proteínas organizadas em domínios funcionais dentro do núcleo da célula. Proteínas cromossômicas geralmente interagem com o DNA para controlar a manutenção, a propagação e a expressão do genoma. Apesar de ter sido identificado um grande número de proteínas envolvidas na replicação, recombinação e reparo do DNA, os mecanismos envolvidos nesses processos e as interações entre eles, assim como entre as proteínas relacionadas, permanecem por ser elucidados em células de mamíferos (Miccoli et al., 2003).

Dentre as proteínas envolvidas na duplicação do DNA, temos a proteína kin17. Essa proteína foi descoberta em 1989, em células de rato, graças a anticorpos policlonais mono-específicos, dirigidos contra a proteína RecA de *Escherichia coli* (Angulo et al., 1989). Entre os eucariotos, os genes kin17 são bastante conservados filogeneticamente, o que aponta para um papel essencial desse gene. Tem sido identificados genes ortólogos da kin17 em humanos, camundongo, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Brugia malayi* e *Schizosaccharomyces pombe*. (Despras, 2006). Por meio do estudo da expressão do gene kin17 em células em cultura de mamíferos, foi observado que a redução no nível de expressão desta é acompanhada de uma redução do crescimento e da proliferação celular (Biard et al., 2002). A superexpressão da proteína pode induzir mudanças conformacionais na cromatina, hipótese consistente com fato de que uma fração da proteína está associada à cromatina (Biard et al., 1999; Kannouche e Angulo, 1999).

É reportado também que a proteína ativada por estresse de radiação UV, kin17, está envolvida na replicação, recombinação e reparo do DNA (Despras et al., 2003; Mazin et al., 1994a). Análises por meio de técnicas de imunofluorescência indireta e microscopia eletrônica demonstraram que a proteína kin17 está associada à cromatina, formando focos de replicação por todo o nucleoplasma (Kannouche et

al., 2000). Provavelmente, a proteína kin17 deve participar como uma proteína acessória na replicação do DNA, promovendo a interação entre a replicação e o reparo do DNA, como componente de complexos proteicos de alto peso molecular (Biard et al., 2002; Masson et al., 2003; Miccoli et al., 2005).

Recentemente, foi reportada a clonagem e seqüência das proteínas de reconhecimento de origens de replicação, ORC, *Bm1* a *Bm6* em *Bombyx mori* (Yang et al., 2011). É relatado que essas proteínas apresentam domínios conservados com as proteínas descritas em mamíferos. Esses resultados reforçam a importância da utilização desse sistema para estudos de replicação do DNA em eucariotos.

Bombyx mori L., popularmente conhecido como bicho-da-seda, foi descrito pela primeira vez por Linnaeus no ano de 1758. Este lepidóptero apresenta metamorfose completa, ou seja, passa por quatro estágios no seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e mariposa (Aruga, 1994). O produto secretado pelas glândulas sericígenas do *B. mori* é de relevância para a indústria têxtil. Os fios de seda possuem um alto valor comercial e características únicas, como brilho, suavidade e textura (Fernandez et al., 2005). Além de sua importância econômica, o *B. mori* representa um organismo modelo para estudos básicos, devido a suas características de fácil manuseio e criação, rápida reprodução e grande quantidade de descendentes. É considerado o segundo inseto mais estudado no mundo, estando atrás somente de *Drosophila melanogaster* (Nagaraju, 2000; Parthasarathy e Gopinathan, 2005). Os estudos com este inseto se iniciaram antes de 1900, sob o patrocínio da indústria da seda. Em 1930, muitas pesquisas na área da genética já haviam sido reportadas, possibilitando hoje reconhecer mais de 400 mutações que afetam diversos aspectos do organismo, como morfologia, desenvolvimento, comportamento e até mesmo características consideradas de importância econômica (Nagaraju e Goldsmith, 2002).

Além de estudos de melhoramento genético, visando a obter maior quantidade e melhor qualidade de seda, o *B. mori* vem sendo utilizado em diversas outras áreas de interesse científico como organismo modelo. Dentre estas, podemos citar: expressão gênica (Sreekumar et al., 2011), polimorfismo gênico (Wang et al., 2012), estrutura celular (Ichikawa et al., 1995), estudos de infecção viral (Dourado et al., 2011) e metabolismo do DNA (Zhang, 2012).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Bombyx mori*

2.1.1. Classificação

Bombyx mori L., popularmente conhecido como bicho-da-seda, foi descrito, pela primeira vez, por Linnaeus no ano de 1758. Pertence ao reino Animalia, filo Artropoda, classe Insecta, ordem Lepidoptera, família Bombycidae, gênero *Bombyx*. Por meio de seus aspectos filogenéticos, infere-se que *B. mori* tenha sua origem na China, a partir de *Bombyx mandarina*, de origem Chinesa, há cerca de 4.600 anos (Yoshitake, 1968). Este lepidóptero é holometabólico, ou seja, apresenta metamorfose completa, passando assim por quatro estágios distintos no seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e mariposa, sendo que este último corresponde a fase adulta (Aruga, 1994). Na fase larval, apresentam, em geral, quatro ecdises com cinco ínstars (Figura 1).

Durante as ecdises, o *Bombyx mori* L. entra em estado de repouso, cessa a alimentação e troca de tegumento. O bicho-da-seda se alimenta apenas na fase larval e tem uma dieta herbívora exclusivamente de folhas frescas de amoreira. Ao longo desta fase, a larva aumenta quase que setenta vezes seu tamanho original, ocupando quatro vezes mais o espaço inicial. No final do 5º ínstar, a larva pára de se alimentar, inicia a fiação do casulo de seda, que é formado principalmente pelas proteínas fibroína e sericína, convertendo-se em pupa. Nesta fase de pupa, o hormônio da muda, ecdisona, é detectado em vários tecidos larvais, assim como a glândula sericígena e pró-torácica. Estes tecidos apresentam morte celular programada com subsequente histólise, já os tecidos do adulto são formados por meio da proliferação e diferenciação celular (Tsuchida e Wells, 1988). Assim, durante a fase de pupa, o lepidóptero se transforma em mariposa.

A formação dos casulos se dá pela secreção de fibroína e sericina por meio do par de glândulas sericígenas localizadas na região torácica. A fibroína endurece em finos fios de seda, juntamente com a sericina, que é responsável por consolidar os fios de seda (Corradello, 1987). Uma terceira categoria de proteínas constituintes do casulo, denominadas seroína 1 e seroína 2, foi caracterizada molecularmente nos

lepidópteros *Galleria mellonella* e *B. mori*. Essas proteínas atuam como agentes antimicrobianos, protegendo o casulo de fungos e bactérias (Zurovec et al., 1998).

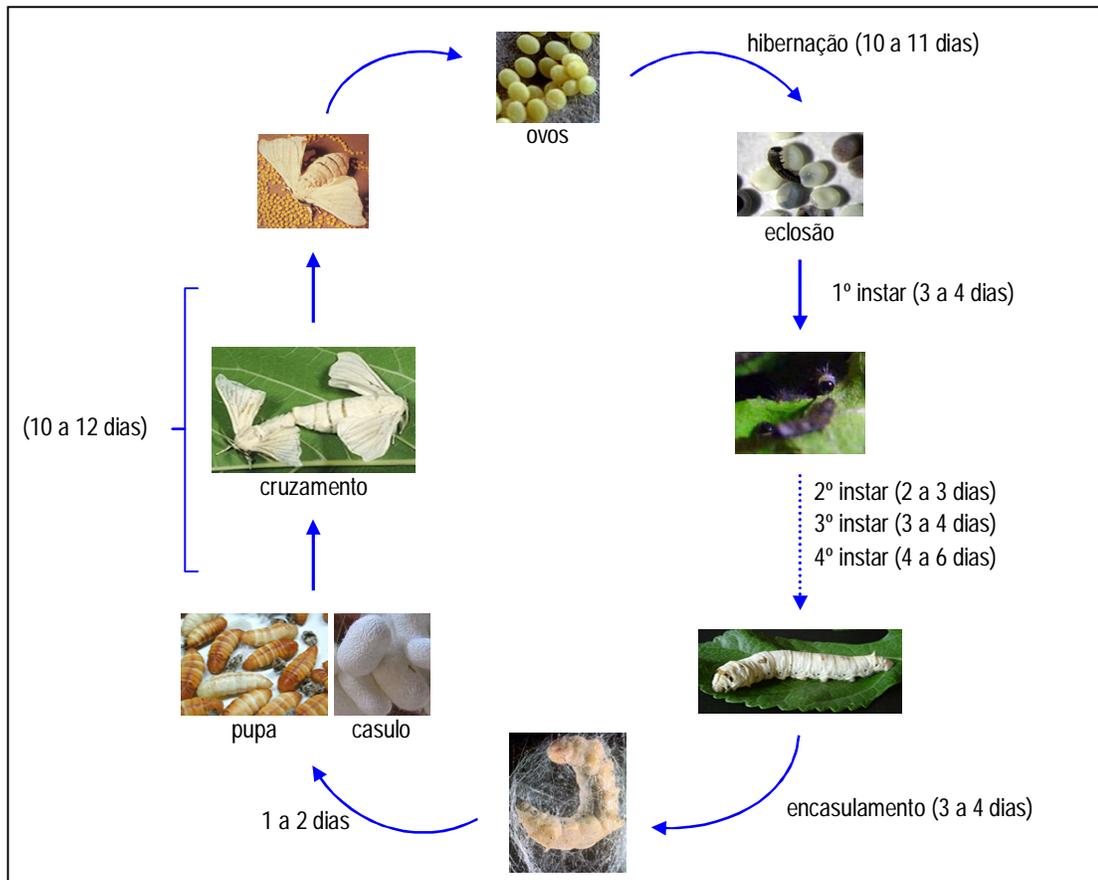


Figura 1 - Ciclo de vida de *Bombyx mori*.

Existem diferentes raças de bicho-da-seda que podem ser classificadas de diversas maneiras, como, por exemplo, de acordo com a sua origem geográfica, o voltinismo, o número de ecdises ou até mesmo a cor do casulo (Aruga, 1994):

2.1.1.1. Classificação por origem

- Japonesa: apresenta ovos de cor cinza-arroxeados; casulo branco, alongado e de tamanho médio; ciclo uni e bivoltino com quatro ecdises.

- Chinesa: ovos esverdeados; lagartas jovens e pouco resistentes ao calor e de corpo branco; casulo elíptico ou esférico, branco, amarelo-ouro, ou verde; fibra fina e comprida; ciclo menor que a japonesa; uni, bi e polivoltino, com até três ecdises.
- Européia: ovos maiores do que de outras origens da espécie; lagartas maiores, com manchas no corpo, pouca resistência ao calor e maior ciclo; mais suscetíveis a doenças pebrina e poliedrose; casulo oval ou alongado, branco ou rosado; ciclo monovoltino.
- Indiana ou Equatorial: ovos brilhantes; lagartas menores, mais resistentes ao calor e com ciclo curto; casulo cônico, pequeno, branco ou esverdeado, com pouco teor de seda; fibra fina; ciclo polivoltino.
- Coreana: ciclo da lagarta curto; casulo alongado, branco ou amarelo; univoltino com três ecdises.

2.1.1.2. Classificação por voltinismo

- Monovoltino (um ciclo anual): ocorre nas regiões frias; ciclo larval mais longo; maior crescimento do corpo; boa qualidade dos casulos; menor resistência a doenças e às altas temperaturas e umidade.
- Bivoltino (dois ciclos anuais): ocorre nas regiões subtropicais; ciclo lagarta menor; maior resistência ao calor; qualidade inferior dos casulos; mais utilizadas pelos sericultores.
- Polivoltinismo (vários ciclos anuais): ocorre nas regiões tropicais; ciclo de lagarta curto; maior resistência ao calor e a doenças; casulos pequenos; baixo teor de seda.

2.1.1.3. Classificação por número de ecdises ou de mudas

- Três ecdises: ciclo larval mais curto; resistente a doenças; lagartas e casulos pequenos; fibra mais fina; espécie de origem coreana e chinesa.
- Quatro ecdises: mais utilizada pelos criadores; lagartas e casulos médios.
- Cinco ecdises: mutação da origem de quatro ecdises; lagarta de ciclo longo; casulos maiores; fibra mais grossa.

2.1.2. Origem

Considerando os aspectos filogenéticos, é provável que a origem do *Bombyx mori* tenha sido na China, a partir da espécie selvagem *Bombyx mandarina*, há cerca de 4.600 anos (Yoshitake, 1968). Estes dados se baseiam também na semelhança morfológica e fisiológica entre as duas espécies, mesmo que ainda haja controvérsias a respeito do número de cromossomos (Goldsmith et al., 2005) (Figura 2).

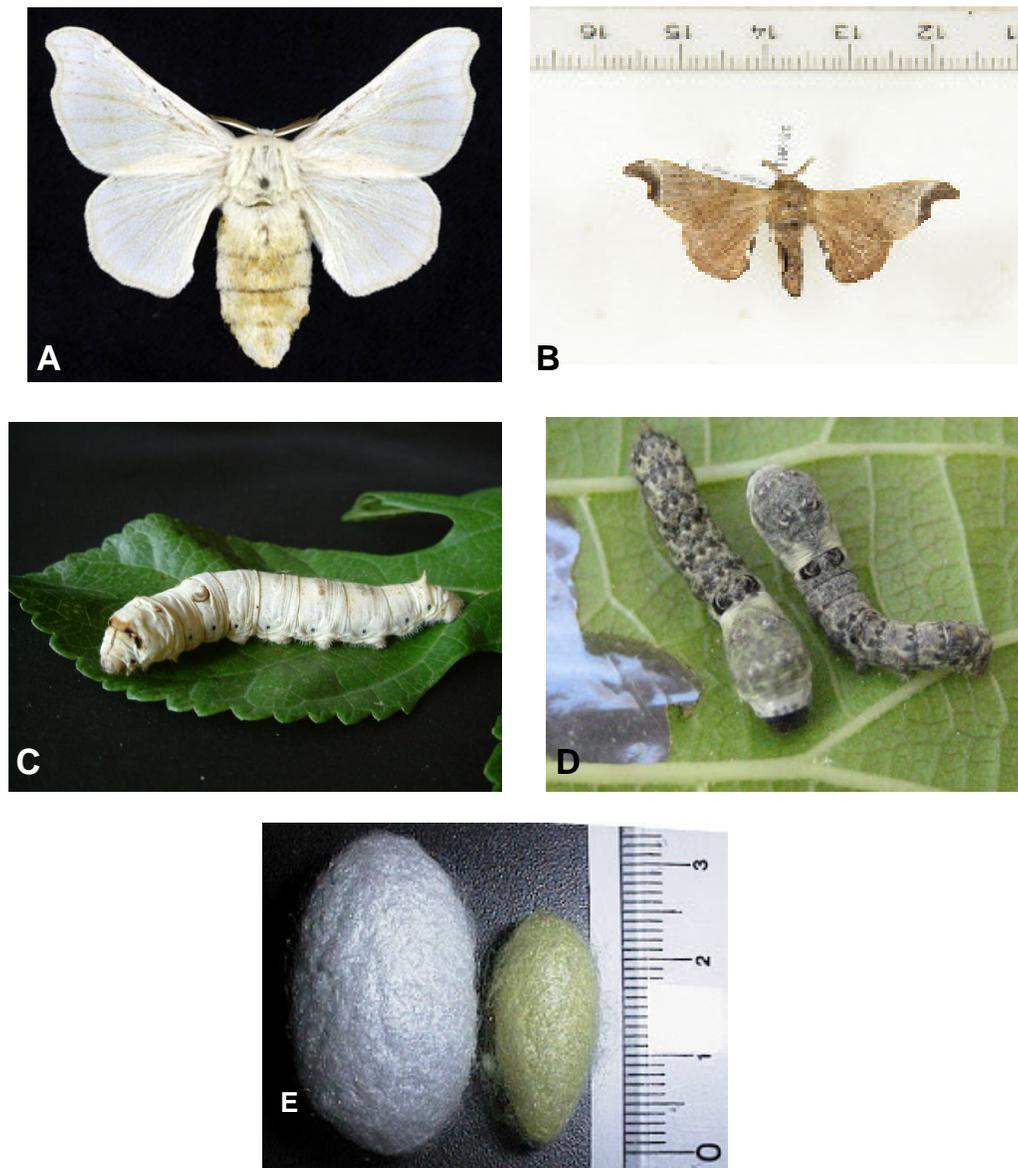


Figura 2 - Comparação entre a morfologia da mariposa, larva e casulos de *Bombyx mori* (A; C; E – casulo à direita) e *Bombyx mandarina* (B; D; E – casulo à direita).

A espécie *B. mori*, possivelmente tenha se originado do processo de domesticação de sua espécie selvagem, *B. mandarina*, ocorrido há cerca de cinco mil anos. No entanto, existem diversas características bioquímicas e morfológicas que diferenciam as duas espécies relacionadas. *B. mandarina*, por exemplo, pode voar e produz casulos 10 a 20 vezes menor que os genótipos comerciais de *B. mori* (Martinez et al., 2004;).

Devido ao seu antigo processo de domesticação, as lagartas não conseguem se alimentar em seu ambiente natural, necessitando que o alimento seja levado até elas pelo homem. As mariposas, por possuírem asas e aparelho mastigatório degenerados, não podem mais voar ou se alimentar.

O *B. mori*, assim como as abelhas, foram os únicos insetos domesticados com finalidade comercial (Kellogg, 1910). Foi propagado em larga escala e utilizado para a produção de seda, na China, Japão e Europa, chegando ao Brasil apenas no ano de 1740 (Inceoglu et al., 2001).

2.1.3. Sericicultura

A atividade da sericicultura abrange o cultivo da amoreira até a criação do bicho-da-seda, em que a seda é extraída dos casulos. A primeira civilização a utilizar a seda foi a China, e esses dados encontram-se nas escritas de Confúcio¹, que descreve sobre a criação doméstica do bicho-da-seda nos palácios da imperatriz Siling_Chi, esposa do imperador Hoang-Ti, no século XVIII a.C. (Álvarez e Lopes, 2003), controlando-se o ciclo do bicho-da-seda, alimentando-o com folhas de amoreira branca e matando os adultos antes de nascerem, além de se conhecer as técnicas do bobinamento dos filamentos, tecendo-os em fios resistentes que, posteriormente, eram usados para a confecção de tecidos.

A sericicultura tem sido um meio de subsistência econômica para muitos trabalhadores no campo e na cidade. Consequentemente foi um grande fator de globalização durante aproximadamente 2000 anos, a chamada Era da Rota da Seda. A Rota da Seda (Figura 3) era uma série de rotas interconectadas através do sul da Ásia, usadas no comércio da seda entre o Oriente e a Europa provavelmente estabelecidas a partir do VIII século a.C. (Elisseeff, 1998).

¹Confúcio foi a figura histórica mais conhecida na China como mestre, filósofo e teórico político. Sua doutrina, o confucionismo, teve forte influência não apenas sobre a China mas também sobre toda a Ásia oriental. Na sua época, a China estava praticamente dividida em reinos feudais cujos senhores dependiam muito pouco do rei.



Figura 3 - Rota da seda.

Os antigos povos do Saara possuíam animais domésticos provenientes da Ásia e foram fundamentais para as trocas entre estes continentes até a descoberta do caminho marítimo para a Índia. Conectava Chang'an (atual Xi'an), na China, a Antioquia, na Ásia Menor, assim como a outros locais. Sua influência expandiu-se até a Coréia e o Japão. Formava a maior rede comercial do Mundo Antigo. Estas rotas não só foram significativas para o desenvolvimento e florescimento de grandes civilizações, como o Egito Antigo, a Mesopotâmia, a China, a Pérsia, a Índia e até Roma, mas também ajudaram a fundamentar o início do mundo moderno. Rota da seda é uma tradução do alemão *Seidenstraße* e a primeira denominação do caminho feita pelo geógrafo alemão Ferdinand von Richthofen, no século XIX (Elisseff, 1998).

A sericicultura é a principal fonte econômica para cerca de 30 milhões de famílias em países como a China, Índia, Vietnã e Tailândia. E não seria diferente para o agronegócio brasileiro, pois a atividade pode contribuir para o desenvolvimento sustentável do país, por meio da inclusão social, por ser uma atividade de baixo impacto ambiental e que gera riqueza, ao proporcionar trabalho no campo, com a criação do bicho-da-seda e o cultivo da amoreira, e, na cidade, com a indústria de fiação e o comércio. Portanto, a atividade da sericicultura proporciona importantes aspectos sócio-econômicos: é uma cultura alternativa, gera produto de exportação, fixa o homem no campo, apresenta pouca dependência

climática, tem pequeno custo de produção, além de contribuir para a racionalização da mão-de-obra.

No Brasil, a seda foi introduzida somente no século XIX, durante o reinado de D. Pedro I, no estado do Rio de Janeiro, no município de Itaguaí, onde foi instalada a primeira indústria de seda nacional, a Companhia Imperial Seropédica Fluminense. Posteriormente, a atividade se desenvolveu em Minas Gerais, com a instalação da primeira Estação Experimental de Sericicultura, no município de Barbacena, em 1912. Em 1921, a atividade recebeu estímulo para se instalar em São Paulo, com a criação da S/A Indústria de Seda Nacional, em Campinas. Em 1940, foi fundada em Bastos (SP), por imigrantes japoneses, a Sociedade Colonizadora do Brasil, *Brajiru Takushoku Kumiai*, da qual originou a Fiação de Seda BRATAC S.A., hoje a maior e única indústria de fiação de seda que atua no Brasil.

Na sericicultura, é de grande valor comercial a obtenção de híbridos que apresentem um alto rendimento de casulos por grama de ovo, resistência ao cultivo no campo e qualidade do fio de seda. As raças japonesas apresentam alto teor de seda ao casulo, e as raças chinesas apresentam maior resistência ao cultivo no campo. Desta forma, para obtenção do híbrido, procura-se misturar as características genéticas das raças japonesas e chinesas puras. As raças puras são resultantes do cruzamento de raças de mesma origem entre si, de modo a obter uma raça pura japonesa e outra raça pura chinesa. O cruzamento destas resulta no bicho da seda híbrido (Fernandez et al., 2005).

2.1.4. Patógenos

Bombyx mori é susceptível a muitas doenças, podendo estas serem causadas por bactérias, fungos e vírus. As doenças causadas por patógenos ocorrem em quase todas as áreas de criação do mundo, sendo que as doenças virais são responsáveis por quase 70% da perda da produção, representando mundialmente um sério problema para a sericicultura (Sengupta et al., 1990; Brancalhão, 2002).

Os vírus entomopatogênicos da família Baculoviridae infectam predominantemente insetos holometábolos, particularmente da ordem Lepidoptera, sendo, assim, as sericulturas um grande alvo destes. Os vírus desta família são

conhecidos como baculovírus e taxonomicamente divididos em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV; Figura 4) e *Granulovirus* (GV). No Brasil, a primeira observação notificada foi a da presença de NPV em culturas de híbridos do bicho-da-seda em São Paulo (Gatti et al., 1976). No Paraná, a primeira descrição foi realizada por Brancalhão (2002).

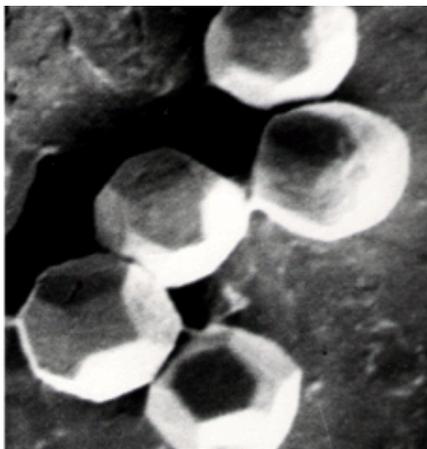


Figura 4 - Micrografia do poliedro viral de *Bombyx mori* (BmNPV - Bombyx mori nucleopolyhedrovirus) (Brancalhão, 2002). VEJA SE ESTÁ CERTO

Em Maringá, a Cooperativa Agroindustrial de Maringá (Cocamar) fez à Universidade Estadual de Maringá (UEM) a doação de um banco de germoplasma, composto de 16 matrizes chinesas e japonesas. Com a obtenção deste banco e sabendo que a herança genética destas raças é completamente desconhecida, várias pesquisas vêm sendo realizadas. Na UEM, o grupo da Profª Drª Maria A. Fernandez e na UNIOESTE (Universidade Estadual do Oeste do Paraná) e o grupo da Profª Drª Rose M.C. Brancalhão desenvolvem projetos de genética molecular e de resistência a patógenos com estas 16 matrizes.

2.1.5. Importância

O *B. mori* é de relevante importância econômica para as indústrias têxteis, pois seu produto de secreção, os fios de seda, tem alto valor comercial e possui características únicas, como brilho, suavidade e textura, apresentando excelente

qualidade de acabamento e uma resistência natural ao amarrotamento. Quando misturada com outros fios, é possível desenvolver tecidos tão resistentes que o homem ainda não conseguiu igualar com outras fibras sintéticas, como o nylon e o poliéster (Fernandez et al., 2005).

Esta espécie é muito importante economicamente e é o único inseto realmente domesticado que perdeu suas características selvagens, sendo selecionado há milhares de anos para melhorar a produção de seda, havendo mais de 3.000 linhagens conhecidas. No entanto, estes insetos também têm sido usados para produzir proteínas recombinantes (Tamura et al., 2000; Thomas et al., 2002; Tomita et al., 2003; Imamura et al., 2003), biorreatores (Chen et al., 2006; Hofmann et al., 2006; Zhang et al., 2006), a seda como fonte de biomateriais como mostrado por Altman et al., (2003), Huang e Li (2004), Servoli et al., (2005), Wang et al., (2006; 2007) e as crisálidas para a remoção de metais pesados de águas contaminadas (Paulino et al., 2006).

O *B. mori* é hoje um organismo modelo em estudos científicos básicos, devido as suas características de fácil manuseio e criação. É considerado o segundo inseto mais estudado no mundo, estando atrás somente de *Drosophila melanogaster* (Nagaraju, 2000; Parthasarathy e Gopinathan, 2005). Apresenta grande importância econômica, pois o produto de secreção de suas glândulas sericígenas, uma proteína filamentosa que origina o fio da seda, tem alto valor para a indústria. Com o patrocínio da indústria da seda, os estudos com este inseto iniciaram-se antes de 1900 e, em 1930, muitas pesquisas na área da genética já haviam sido reportadas, possibilitando hoje reconhecer mais de 400 mutações que afetam diversos aspectos do organismo, como morfologia, desenvolvimento, comportamento e até mesmo as características consideradas de importância econômica (Nagaraju e Goldsmith, 2002).

2.2. Proteína de reparo kin17

A proteína kin17 foi descoberta, em 1989, em células de rato, graças a anticorpos policlonais monoespecíficos, dirigidos contra a proteína RecA de *Escherichia coli* (Angulo et al., 1989). Em bactérias, a proteína RecA é responsável pelo reparo do DNA em eventos como a recombinação, a mutagênese e a regulação de genes da resposta SOS. A detecção de uma proteína homóloga em eucariotos

era o objetivo dessa análise, visto que esses processos também ocorrem nessas células (Anderson e Kowalczykowski, 1998). Entre os eucariotos, os genes kin17 são bastante conservados filogeneticamente, o que aponta para um papel essencial desses genes. Tem sido identificados genes ortólogos da kin17 em humanos, camundongo, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Brugia malayi* e *Schizosaccharomyces pombe* (Despras, 2006).

Proteínas de localização nuclear geralmente interagem com o DNA para controlar a manutenção, propagação e expressão do genoma. Apesar de ter sido identificado um grande número de proteínas que estão envolvidas na replicação, recombinação e reparo do DNA, os mecanismos envolvidos nesses processos e as interações entre eles, assim como entre as proteínas relacionadas, permanecem por ser elucidados.

A estrutura da proteína kin17 tem sido estudada em camundongos, sendo possível observar que ela apresenta cinco domínios funcionais, como pode ser visto na Figura 5 e na Figura 6 (Kannouche et al., 1997; Mazin et al., 1994b).

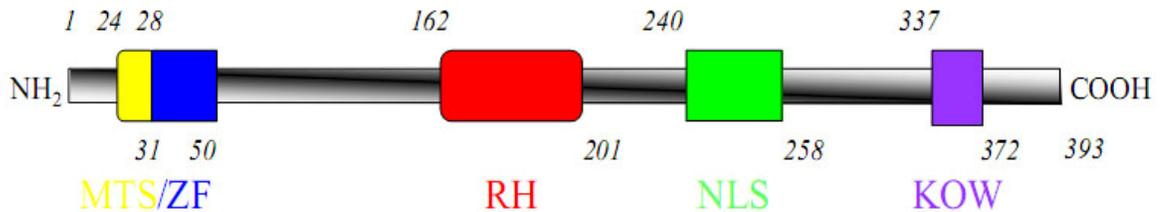


Figura 5 - Domínios funcionais da proteína kin17: MTS (sinal putativo de localização mitocondrial); ZF (dedo de zinco); RH (domínio de homologia a proteína RecA de *E. coli*); NLS (sinal de localização nuclear); KOW (motivo KOW). Original de Despras, 2006.

A proteína kin17 apresenta quatro domínios particulares (Despras, 2006):

- Um sinal de localização nuclear, NLS (nuclear localization signal), que está situado entre os aminoácidos 240 e 258 da proteína kin17. Ele assegura a localização nuclear da proteína, a qual possui uma distribuição intranuclear em compartimentos específicos, que se co-localizam com sítios de síntese de DNA.
- Um motivo dedo de zinco, ZF (zinc finger) do tipo Cx2Cx12Hx5H, que está situado entre os resíduos 28 e 50, permitindo a interação da proteína Kin17 com o

DNA (Mazin et al., 1994b). Este dedo de zinco é similar ao da PARP (poly ADP-ribose polymerase), uma proteína que está envolvida no reparo do DNA.

- Uma região de 40 aminoácidos situados na região mediana da proteína (resíduos 162 a 201), que apresenta uma homologia de 49% com a extremidade C-terminal da proteína RecA bacteriana (Angulo et al., 1991). Esta região de homologia explica a detecção da kin17 por anticorpos dirigidos contra a RecA, sendo uma região fortemente conservada na sequência da proteína kin17. De fato, a deleção deste fragmento inibe a reação cruzada com os anticorpos dirigidos contra a RecA e provoca uma redistribuição da kin17 no núcleo (Kannouche et al., 1997).

- Um motivo denominado KOW foi identificado entre os resíduos 330 e 363, confirmado por meio de análise de cristalografia da extremidade C-terminal da proteína kin17 (le Maire et al., 2006). Alguns autores indicam que os motivos KOW estão, dentro do metabolismo do RNA, relacionados com interações proteína-proteína e proteína-RNA (Steiner et al., 2002).

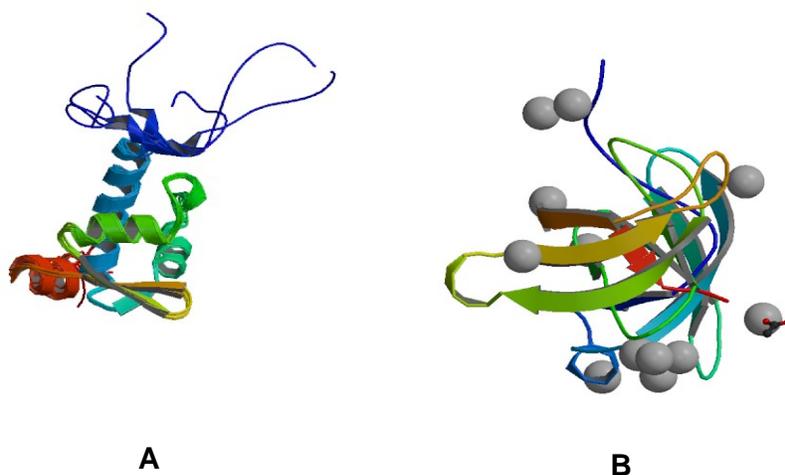


Figura 6 - Imagem dos modelos estruturais de regiões da kin17 humana depositadas no banco de dados Protein Data Bank (www.pdb.org). Região A: formada pelos resíduos 51-160 (pdb id:2V1N), em B: região formada pelos resíduos 269-388 (pdb id: 2CKK).

Por meio do estudo da expressão do gene kin17 em células de carcinoma colorretal humano (linhagem RKO), utilizando RNA anti-senso para silenciar o RNA mensageiro da proteína, foi observado que a redução no nível de expressão desta é acompanhada de uma redução do crescimento e da proliferação celular, além de um acúmulo de células no começo ou no meio da fase S do ciclo celular (Biard et al.,

2002). A análise por citometria de fluxo de células que superexpressam a proteína kin17 revelou uma alteração no padrão de intercalamento do iodeto de propídeo ao DNA, um composto fluorescente utilizado nesta técnica para marcar a molécula. Assim, a superexpressão da proteína poderia induzir as mudanças conformacionais na cromatina, hipótese reforçada pelo fato de uma fração da proteína estar associada à cromatina (Biard et al., 2002). Além disso, esse fato poderia também explicar as alterações nucleares observadas em células que superexpressam a kin17 quando transfectadas com o cDNA da proteína. Essas alterações consistem na diminuição da taxa de replicação e na inibição da proliferação celular (Biard et al., 1999; Kannouche e Angulo, 1999).

Recentemente, têm sido descritos resultados que apontam que a proteína kin17 é ativada por estresse (Kannouche et al., 1998). Foi observado, por meio de técnicas de imunofluorescência indireta e microscopia eletrônica, que essa proteína está associada à cromatina, formando focos de replicação por todo o nucleoplasma, similar àqueles observados com outras proteínas envolvidas no splicing de RNA, na replicação e reparo do DNA. Cogita-se a hipótese de que ela possa participar como fator na replicação do DNA, criando uma ponte entre a replicação e o reparo do DNA, sendo esta ponte mediada por complexos proteicos de alto peso molecular (Mazin et al., 1994a; 1994b; Kannouche et al., 2000; Biard et al., 2002; Despras et al., 2003; Masson et al., 2003; Miccoli et al., 2005).

Os genes da kin17 estão situados no cromossomo 2, em murinos, e no braço curto do cromossomo 10 nos seres humanos (Angulo et al., 1991). Estes genes possuem, respectivamente, 391 e 393 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular de 45 e 47kDa, apresentando ambas um ponto isoelétrico de 9,3 (Kannouche et al., 2000).

A distribuição nuclear da proteína kin17 ao longo do ciclo celular apresenta alterações dinâmicas entre a estrutura da cromatina e a matriz nuclear (Miccoli et al., 2003) e foi constatado que esta proteína está associada ao complexo multiproteico de replicação do DNA, em conjunto com outras proteínas, como a RPA70, PCNA e DNA polimerase α . Complexos multiproteicos isolados de células em cultura capazes de realizar replicação do DNA *in vitro* apresentam atividade reduzida quando a kin17 é inibida por imunodepleção. Além disso, a kin17 associa-se diretamente a certas regiões de origens de replicação (Miccoli et al., 2005). Em muitas linhagens celulares derivadas de tumores, foi constatado um alto nível de

expressão da kin17 (Kannouche et al., 2000; Despras et al., 2003), assim como em tecidos tumorais de pacientes de câncer de mama (Zeng et al., 2011). Este último estudo apontou que a kin17 pode ser um potencial alvo no tratamento desse tipo de câncer e correlacionou a expressão dessa proteína com fatores de regulação do ciclo celular, como a ciclina D1 e o ERK1/2.

Os dados obtidos até o momento sugerem que a kin17 pode atuar como um elo entre processos de replicação e reparo do DNA, impedindo a parada do ciclo, celular devido à presença de lesões não reparadas no DNA. Além disso, a proteína kin17 também é parte do spliceossomo (Rappsilber et al., 2002) e pode ser capaz de se associar diretamente a moléculas de mRNA durante a espermatogênese, sugerindo a atuação dessa proteína também no processamento do RNA. Tais processos podem ser regulados pela presença do motivo KOW (Pinon-Lataillade et al., 2004).

Tendo em vista a importância do conhecimento sobre os mecanismos de envolvimento da proteína kin17 nos processos de replicação, recombinação e reparo do DNA, propomos neste trabalho analisar a detecção da proteína kin17 em cultura de células de ovário de *B. mori*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais Biológicos

3.1.1. Lagartas

Foram utilizadas lagartas híbridas de 5º ínstar de *B. mori*, gentilmente cedidas pela Fiação de Seda BRATAC S.A., uma indústria sericícola da região noroeste do Estado do Paraná, Brasil. Os insetos foram mantidos em ambiente controlado (temperatura média de 25°C e umidade relativa média do ar de 70% de ventilação), sendo alimentadas três vezes ao dia com folhas frescas de amoreira (*Morus sp*).

3.1.2. Células

A linhagem de células *Bm5* de *Bombyx mori* (Figura 7) é derivada de tecido embrionário e foram gentilmente cedidas por Maria Elita B. Castro (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia). As células foram inoculadas na concentração de aproximadamente 6×10^5 células/mL em garrafas de cultura de 25cm² com meio TNMFH (GIBCO® Invitrogen Corporation, CA, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino e adicionado 1% de ampicilina-estreptomicina (GIBCO® Invitrogen Corporation, CA, USA). Estas foram mantidas a 27°C e replicadas assim que atingiram a confluência de 90 a 100% da garrafa de cultura.

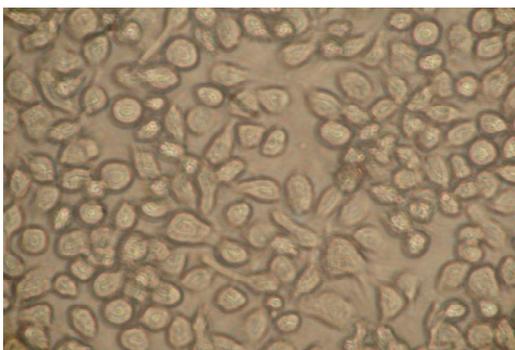


Figura 7 - Células da linhagem *Bm5* derivadas de ovário de *Bombyx mori*. (aumento 20X).

3.2. Dissecção e preparação das amostras

Os tecidos larvais, túbulo de Malpighi, sistema nervoso, gônadas (ovários e testículos), corpo gorduroso e glândula sericígena (anterior, medial e posterior) foram dissecados e transferidos para um tubo eppendorf 1,5 mL, contendo tampão de lise (lauril sulfato de sódio 2%; EDTA 10mM; Tris-HCl 0,1M pH 8,0) e armazenados a -80°C. As células *Bm5* de culturas de 4-5 dias (monocamada) foram coletadas por raspagem e centrifugadas a 448G, para a retirada do meio de cultura, e resuspendidas no mesmo tampão de lise. As amostras foram extraídas por meio de homogeneização, com auxílio de pistilos e, em seguida, fragmentadas por sonicação em cinco etapas, com duração de 30 segundos cada, na potência média (3) do equipamento Fischer Scientific. Posteriormente, as amostras foram resuspendidas em 20µL de tampão de corrida para proteínas (Red Loading Buffer, New England Biolabs), adicionado de ditioneitol (DTT), exceto para as amostras de glândulas sericígenas, nas quais foram utilizados 40 µL do tampão para a ressuspensão do material devido a sua baixa solubilidade.

3.3. Inoculação de células *Bm5* com BmNPV

Foram inoculadas 2×10^6 cels/mL, em cada frasco T-25. No controle, foram adicionados 1mL de meio TMNFH sem soro fetal bovino para simular as mesmas condições celulares que nas células infectadas. No infectado, foram adicionados 1 mL do inóculo viral de BVs e homogeneizados. As células foram homogeneizadas e incubadas, por 1 hora, a 27°C para a infecção. Após 1 hora do tempo de inoculação, retirou-se o meio incompleto, das células controle, e das células infectadas foram retirados o meio com os BVs. Foram adicionados meios TMNFH com soro e as células foram analisadas no microscópio de luz invertido. As células foram incubadas na estufa bacteriológica pelo período em que seriam analisadas: 0, 12, 24 e 48 horas.

3.4. Gel de poliacrilamida

As amostras de proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional do tipo descontínuo, na presença de dodecil sulfato de

sódio (SDS-PAGE), segundo a técnica descrita por Laemmli (1970). Para a preparação dos géis, foi utilizada uma solução de acrilamida/bis-acrilamida na proporção de 29:1%. O gel de empilhamento foi preparado a uma concentração de 4% (0,125M de Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% de SDS) e o gel de separação a uma concentração de 12% (0,375M de Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% de SDS). As amostras foram incubadas a 100°C, por 5 minutos e aplicadas no gel. A separação eletroforética foi realizada a 80 volts, por 20 minutos, no gel de empilhamento, e a 110 volts, por 40 minutos, no gel de separação.

3.5. Western blot

As proteínas separadas em gel de poliacrilamida foram transferidas para membranas de nitrocelulose e a imunodeteção da proteína realizada com anticorpos policlonais anti-kin17. Foram utilizados dois anticorpos (Santa Cruz Biotechnology Inc.), que detectam domínios diferentes da proteína. O K36 (sc-32768) reconhece uma seqüência de aminoácidos denominada KOW, localizada ao longo da região carboxi-terminal da proteína kin17 humana. O K58 (sc-32769), reconhece uma seqüência localizada ao longo do domínio homólogo ao da RecA (domínio central da proteína kin17 humana). A eficiência da eletrotransferência foi avaliada pela coloração das membranas com o corante *Ponceau S* para proteínas. O corante foi removido por sucessivas lavagens com água bidestilada e, posteriormente, com TBS-T 1X (Tris-HCl 100mM pH 7,5; NaCl 1,5M e Tween-20 0,05%). A etapa de bloqueio foi realizada com solução de bloqueio (albumina a 5% em TBS-T 1X), por meio de incubação, por 1 hora, sob agitação, a 25°C. Sequencialmente, a membrana foi incubada com anticorpos primários (diluição 1:10000) em TBS-T, por 16 horas, a 4°C, sob agitação. A incubação com os anticorpos secundários (goat anti-mouse HRP Dako (P0447) - diluição 1:5000) foi realizada por 1 hora, sob agitação, em temperatura ambiente. A revelação foi obtida utilizando o kit ECL Plus da GE Healthcare. Os sinais de quimiluminescência foram detectados em equipamento Storm[®] (405 nm), disponível na Central de Produtos Naturais do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da UEM.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Detecção da proteína kin17 em tecidos larvais de *Bombyx mori*

Pode-se observar na Figura 8A a imagem da membrana de nitrocelulose corada com *Ponceau S*, evidenciado que a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana foi realizada com sucesso. Esta figura apresenta diversas bandas coradas em vermelho que representam as proteínas transferidas.

Na Figura 8B podem ser observadas a imagem das proteínas detectadas com os anticorpos primários K36 e K58. Estes anticorpos reconhecem regiões distintas da proteína de reparo kin17 de humanos, como descrito anteriormente.

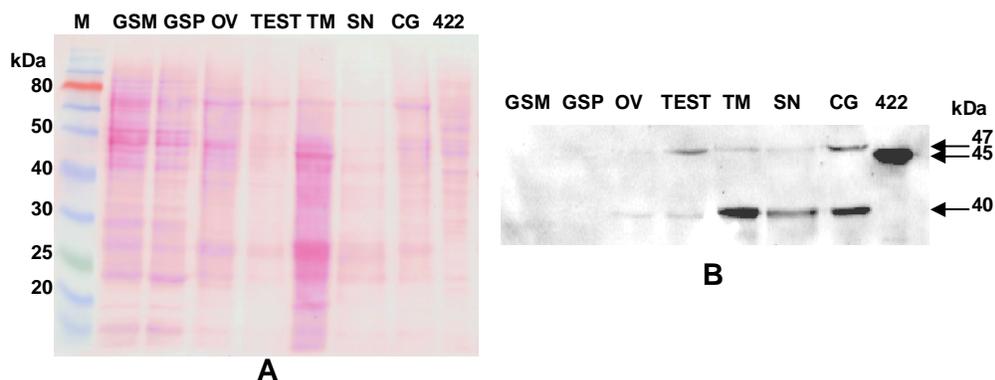


Figura 8 - Detecção de kin17 em tecidos larvais de *Bombyx mori*. A) membrana de nitrocelulose após a transferência dos polipetídeos, corada com *Ponceau S*. B) imunodeteção com anticorpos para kin17. M, marcador de peso molecular Biolabs Color plus. Amostras: GSM, glândula sericígena, região medial; GSP, glândula sericígena, região posterior; OV, ovário; TEST, testículo; TM, túbulo de Malpighi; SN, sistema nervoso; CG, corpo gorduroso; 422, extrato de células de pulmão em cultura de hamster Chinês.

São observadas duas isoformas dessa proteína. Uma de aproximadamente 47kDa é detectada em todos os tecidos, exceto em glândulas sericígenas. Esse peso molecular é similar ao valor de ~45kDa encontrado na amostra utilizada como

controle positivo (extrato de células de pulmão em cultura de hamster Chinês). Outra isoforma de aproximadamente 40kDa também foi detectada em ovário, testículo, túbulo de Malpighi, sistema nervoso e corpo gorduroso. No entanto, essa isoforma, assim como a outra, não foi observada em glândulas sericígenas.

Observa-se na figura 8A, corada com *Ponceau S*, que as concentrações dos extratos dos tecidos não estão completamente iguais. Entretanto, as glândulas sericígenas apresentam bandas proteicas, mas, quando detectadas com o anticorpo, não apresentam a proteína kin17. No entanto, as amostras de sistema nervoso e testículo, na membrana corada com *Ponceau S*, apresentaram menor concentração de proteínas totais, quando comparadas a outras amostras, mas expressam em níveis elevados a proteína kin17, detectadas com os anticorpos.

Ao analisar a detecção somente com o anticorpo K36, que reconhece a região KOW, localizada ao longo da região carboxi-terminal da proteína kin17 humana (veja Figura 5), não se detectou a proteína em nenhum dos tecidos de *B. mori* (resultados não mostrados). Na figura 9, é observado o alinhamento da sequência de *Bombyx mori* contra a sequência da proteína humana, apresentando a baixa identidade entre as mesmas. Esse resultado implica na afirmação de que as frações protéicas de kin17 possuem uma região de baixa identidade com a proteína kin17 de humanos, indicando que o domínio KOW não faz parte da proteína em *B. mori*.

```

Bombyx      311 RIVDEKIKLKLKLDQNHLETVPSCGRKVRVNVGAXPGGRGHAARRSAPTPTAAXSKRKGPL
Humano      317 KMIDSGDKLKLKLDQTHLETVIPAPGKRILVLNGGYRGNEGTLESINEKTFSATIVIEETGPL
              *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

```

Figura 9 - Alinhamento da sequência proteica de kin17 de *Bombyx mori* contra a sequência humana (em lilás – região KOW).

4.2. Detecção da proteína kin17 em células *Bm5* infectadas pelo BmNPV

Foram observadas as frações de aproximadamente 40 a 47kDa em todos os extratos celulares de células de *Bombyx mori* da linhagem *Bm5*, infectados e controle (Figura 10). Todas as frações apresentaram um aumento da expressão da proteína kin17 ao longo do período de tempo analisado (0, 12, 24 e 48 horas), fato

possivelmente relacionado ao aumento da concentração dessa proteína durante o ciclo celular e o processo de replicação do DNA nessas células.

A expressão da proteína kin17 nos extratos controle e infectados apresentou alterações somente para a fração de ~47kDa, com aumento da expressão até 24 horas e diminuição no extrato de 48 horas de células infectadas. Entretanto, as células dessa fração de 48 horas infectadas se encontravam com indícios de degradação proteica, não podendo essa fração ser considerada para fins de análise. A fração menor é a ~40kDa, a qual pode ser caracterizada como a isoforma da kin17, não apresentou modificação da sua expressão entre células controle e infectadas. Frações protéicas com pesos moleculares superiores a 60kDa podem ser indicativas da interação da kin17 com ubiquitina, resultado de um sistema de degradação e/ou controle de disponibilidade dessa proteína nessas células.

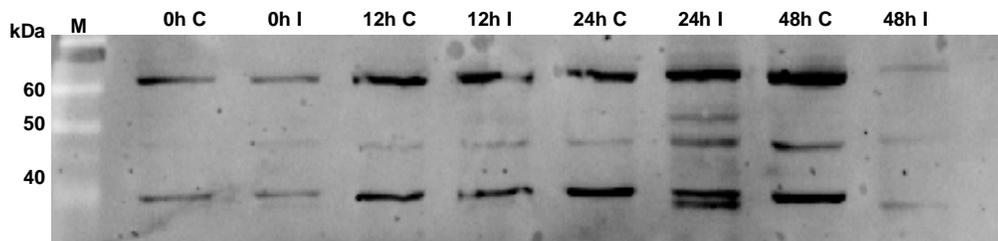


Figura 10 - Proteína de reparo kin17 extraída de células *Bm5*. Imunodeteção, utilizando anticorpos específicos. Amostras: células 0, 12, 24, e 48 horas controle (C) e infectados (I) com *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV). M) *Protein Ladder* (Biolabs).

4.3. Estudo de análises de sequência protéica de kin17 de hamster contra a sequência de disco imaginal de *B. mori*

Foi realizada a conversão da sequência de nucleotídeos para a sequência de aminoácidos de disco imaginal de *B. mori*, por meio do programa computacional ExPASy Bioinformatics Resource Portal, notada no banco de dados com o número de acesso: AK377488.1. Essa sequência proteica foi submetida ao programa computacional ExPASy-Compute pI/Mw tool para o cálculo teórico do peso molecular.

MKHGREKRRKVLNRTSRTKRLKASQKLRWYQCQMCQKQCRDENGFKCHTMSESH
 QRQLLLFADNASKYIDQFSKEFSDGYVELLSRQFGTKRVNANKVYQEYISNRDHLH
 MNATQWETLTDFVKWLGREGKCVVDETEKGFVFTYIDRDPAAIAAQEAKAKKEKM
 DKDDQERMLEFIQKQVEKGGKENDSNIEPTYTELKRESSQERLTFNLNLKRKNEDK
 KSEVLSSSALKSLKSKEDSKRIRIEESTSRQSALDEIMKMEEKAKEKANRKDYWLTE
 GIVVKIVTKSLGDKFYKRKAVVERVIDKYGAEVRIVDEKIKLKLDQNHLETVVPSCGR
 KVRVVGAXPGGRGHAARRSAPTPTAAXSKRKGPLTGRLVKGVEYEDISKLASYTI
D

Figura 11 - Sequência protéica de disco imaginal de *Bombyx mori*. Sublinhado a sequência maior da proteína, com 392 resíduos de aminoácidos; em negrito, a sequência retirada da proteína menor, com 365 resíduos de aminoácidos.

A sequência apresenta dois nucleotídeos de terminação (Figura 11). O primeiro, com 392 aminoácidos, possui um peso molecular de aproximadamente 45.5kDa; a outra sequência, com 365 aminoácidos, possui uma massa de aproximadamente 42.5kDa. A análise computacional dessa sequência mostra que as bandas observadas na imunodeteção dos tecidos e da cultura de células, possuem tamanhos similares aos estimados pelo programa com a sequência de cDNA do disco imaginal.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

Bomby          MKHGREKRRKVLNRTSRTKRLKASQKLRWYQCQMCQKQCRDENGFKCHTMSESHQRQLLLF 60
hamster        MGKSDFLSPKAIANRIKSK--GLQKLRWYQCQMCQKQCRDENGFKCHCMSESHQRQLLLA 57
* :.      *.: * :.* . *****

Bomby          ADNASKYIDQFSKEFSDGYVELLSRQFGTKRVNANKVYQEYISNRDHLHMNATQWETLTD 120
hamster        SENPQQFMDYFSEEFRNDFLELLRRRFGTKRVHNNIVYNEYISHREHIHMNATQWETLTD 117
:.*.:*:* *:*:* *:*:*:* *:*:*:* *:*:*:*:*

Bomby          FVKWLGREGKCVVDETEKGFVFTYIDRDPAAIAAQEAKAKKEKMDKDDQERMLEFIQKQV 180
hamster        FTKWLGREGLCVKVDETPKGWYIQYIDRDPETIRROLELEKKKKQDLDDEKTAKFIEEQV 177
*.****** * **** *:*:* *:*:*:* * * **:* * *:*:* :*:*:*

Bomby          EKGKENDSNIEPTYTELKRESSQERLTFNLNLKRKN---EDKKSEVLSSSALKSLKSK 236
hamster        RRG-LEGKEQETPFVTELSRENDEEKVTFNLNKGAGSSAVATSSKSGSLGPSALKTLGSA 236
.:* *...: *:*:*:*:*:*:*:*:*:* * . .** *..*:*:*:*

Bomby          EDSKRIRIEESTSR-----QSALDEIMKMEEKAKEKANRKDYWLTEGIVVKIVTKSLGD 290
hamster        SSMRKKESSQSSAQPAKPKKKSALDEIMELEEEKKRTA-RTDSDLQPGIIVKIIITPKLGE 295
.. :* . :.*:*:* :*****:*:* *..* *.* ** *:*:*:*:*:*

Bomby          KFYKRKAVVERVIDKYGAEVRIVDEKIKLKLDQNHLETVVPSCGRKVRVVGAXPGGRGH 350
hamster        KYHKKKGVVKEVIDRYTAVVKMIDSGDRLKLDQTHLETVIPAPGRRIILVNLGGYRGNEGT 355
*:*:*:*:*:*:*:* * *:*:* . *****.*:*:*:* *:*:* *:*:*

Bomby          AARRSAPTPTAAXSKRKGPLTGRLVKGVEYEDISKLASSYTID 392
hamster        LESINEKTFSATIVIVETGELKGRRVEGIQYEDISKLA----- 392
. * :* : . .***** *:*:*:*:*

```

Figura 12 - Alinhamento das sequências de disco imaginal de *Bombyx mori* com hamster. Em azul – o motivo dedo de zinco; em verde – NLS (entrada núcleo); Em vermelho – RecA; Em lilás – KOW.

Foi realizado o alinhamento da sequência protéica de disco imaginal de *Bombyx mori* notada contra a sequência da kin17 de hamster (P003494972.1; Figura 12). O alinhamento mostrou que existem similaridades entre as sequências, principalmente no que se refere ao motivo dedo de zinco. Porém a sequência que contém a região KOW, que reconhece a região Carboxil-terminal, mostra-se degenerada ou inexistente em *B. mori*. Pode-se observar, marcado em azul, o dedo de zinco presente nas duas sequências; em verde, o sinal de entrada no núcleo; em vermelho, a região RecA que o anticorpo K58 reconhece; e em lilás a região KOW não aparente em *B. mori*.

5. CONCLUSÕES

Foi possível detectar a proteína kin17 em *Bombyx mori* por meio de anticorpos policlonais monoespecíficos para humanos, dirigidos contra a proteína RecA de *Escherichia coli*.

A imunodeteção com o anticorpo K36, que reconhece uma sequência de aminoácidos denominada KOW, localizada ao longo da região carboxi-terminal da proteína kin17 humana, não conseguiu detectar a proteína kin17 em extratos de células de *Bombyx mori*.

Este trabalho mostrou pela primeira vez a existência de duas isoformas da proteína kin17 em tecidos larvais de *Bombyx mori* e da linhagem celular *Bm5*, derivadas de células embrionárias de ovário de *B. mori*.

A infecção por BmNPV em células *Bm5* influencia na expressão da proteína kin17, em especial a isoforma com ~47kDa. Foi possível observar também que as duas isoformas (com aproximadamente 40kDa e 47kDa) apresentam aumento de sua expressão durante o ciclo celular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ALTMAN, G.H.; DIAZ, F.; JAKUBA, C.; CALABRO, T.; HORAN, R.L.; CHEN, J.; LU, H.; RICHMOND, J.; KAPLAN, D.L. Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, 24:401-416, feb, 2003.

ANDERSON DG AND KOWALCZYKOWSKI SC (1998). Reconstitution of an SOS response pathway: derepression of transcription in response to DNA breaks. **Cell**, 95:975-979.

ÁLVAREZ, F.A.; LÓPEZ, A.E.C. **Sericicultura. Zoologia aplicada**. Madri: Ediciones Díaz de Santos S.A., 2003. 231p.

ANGULO, J.F.; MOREAU, P.L.; MAUNOURY, R.; LAPORTE, J.; HILL, A.M.; BERTOLOTTI, R.; DEVORET, R. Kin, a mammalian nuclear protein immunologically related to *E. coli* RecA protein. **Mutation Research/DNA Repair**, 217:123-134, 1989.

ANGULO, J.F.; ROUER, E.; MAZIN, A.; MATTEI, M.C., TISSIER, A.; HORELLOU, P; BENAROUS, R; DEVORET. R. Identification and expression of the cDNA of Kin17, a zinc finger gene located on mouse chromosome 2, encoding a new DNA-binding protein. **Nucleic Acids Research**, 19:5117-5123, 1991.

ARUGA, H. Silkworm and its Strains. In: ARUGA, H. **Principles of sericulture**. India: CRC Press, 1994. p. 97-111.

BIARD, D.S.F.; KANNOUCHE. P.; LANNUZEL-DRAGOU, C.; MAUFFREY, P.; APIOU, F.; ANGULO, J.F. Ectopic expression of (Mm) Kin17 protein inhibits cell proliferation of human tumor-derived cells. **Experimental Cell Research**, 250:499-509, 1999.

BIARD, D.S.F.; MICCOLI, L.; DESPRAS, E.; FROBERT, Y.; CREMINON, C.; ANGULO, J.F. Ionizing radiation triggers chromatin-bound Kin17 complex Formation in human cells. **The Journal of Biological Chemistry**, 277:19156–19165, 2002.

BRANCALHÃO, R.M.C. Vírus entomopatogênicos no bicho-da-seda. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 24:54-58, 2002.

CHEN, J.; WU, X.F.; ZHANG, Y.Z. Expression, purification and characterization of human GM-SSF using silkworm pupae (*Bombyx mori*) as a bioreactor. **Journal of Biotechnology**, 123:236-247, 2006.

CORRADELLO, E.F.A. **Bicho-da-seda e amoreira: da folha ao fio a trama de um segredo milenar**. São Paulo: Coleção Brasil Agrícola, 1987.101p.

DESPRAS, E.; MICCOLI, L.; CRÉMINON, C.; ROUILLARD, D.; ANGULO, J.F.; BIARD, D.S. Depletion of kin17, a human DNA replication protein, increases the radiosensitivity of RKO cells. **Radiation Research**, 159:748–758, 2003.

DESPRAS, E. **Les proteines kin17, xpc, dna-pkcs et xrcc4 dans la reponse cellulaire aux dommages de l'adn. Etude des relations entre la reparation par excision de nucleotides et la recombinaison non homologue dans un modele syngenique humain**. França: Universite Paris, 2006, p. 250. These (Docteur Aux Biologie Cellulaire et Moléculaire).

DOURADO, L.A.; RIBEIRO, L.F.C.; BRANCALHAO, R.M.; TAVARES, J.; BORGES, A.R.; FERNANDEZ, M.A. Silkworm salivary glands are not susceptible to *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. **Genetics And Molecular Research**, 10:335-339, 2011.

ELISSEEFF, V. **The silk roads: highways of culture and commerce**. China: UNESCO Publishing / Berghahn Books, 1998. 332p.

FERNANDEZ, M.A.; CIFERRI, R.R.; PATUSSI, E.V.; PEREIRA, M.F.; FELIPES, J.; BRAVO, J.P.; ZANATTA, D.B.; GOUVEIA, F.S.; BALANI, V.A. Utilização da biotecnologia na sericicultura brasileira. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 35:56-61, 2005.

GATTI, I.M.; SILVA, D.M.; MATYS, J.C.; NOGUEIRA, N.L.; OLIVEIRA, A.R. Constatação ao microscópio eletrônico de poliedroses em bicho da seda (*Bombyx mori* L.). In: V COLÓQUIO BRASILEIRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA. Piracicaba. **Resumos**. Piracicaba: A Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1976. p. 88-89.

GOLDSMITH, M.R.; SHIMADA, T.; ABE, H. The genetics and genomics of the

silkworm, *Bombyx mori*. **Annual Review of Entomology** 50:71-100, 2005.

HOFMANN, S.; FOO, C.T.; ROSSETTI, F.; TEXTOR, M.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D.L.; MERKLE, H.P.; MEINEL, L. Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery. **Journal Control Release**, 111:219-227, 2006.

HUANG, J.K.; LI, M. Silk protein fiber biomaterials and tissue engineering. **Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery**, 18:127-130, 2004.

IMAMURA, M.; NAKAI, J.; INOUE, S.; QUAN, G.X.; KANDA, T.; TAMURA, T. Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*. **Genetics**, 165:1329-1340, 2003.

ICHIKAWA, T.; HASEGAWA, K.; SHIMIZU, I.; KATSUNO, K.; KATAOKA, H.; SUZUKI, A. Structure of neurosecretory cells with immunoreactive diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide in the silkworm, *Bombyx mori*. **Zoological Science**, 12:703-712, 1995.

INCEOGLU, A.B.; KAMITA, S.G.; HINTON, A.C.; HUANG, QIHONG.; SEVERSON, T.F.; KANG, KYUNG-DON.; HAMMOCK, B. Recombinant baculoviruses for insect control *Pest Management Science*. **Pest Management Science**, 57:981-987, 2001.

KANNOUCHE, P.; PINON-LATAILLADE, G.; MAUFFREY, P.; FAUCHER, C.; BIARD, D.S.; ANGULO, J.F. Overexpression of kin17 protein forms intranuclear foci in mammalian cells. **Biochimie**, 79:599-606, 1997.

KANNOUCHE, P.; ANGULO, J.F. Overexpression of kin17 protein disrupts nuclear morphology and inhibits the growth of mammalian cells. **Journal of Cell Science**, 112: 3215-3224, 1999.

KANNOUCHE, P.; PINON-LATAILLADE, G.; TISSIER, A.; CHEVALIER-LAGENTE O.; SARASIN, A.; MEZZINA, M.; ANGULO, J.F. The nuclear concentration of kin17, a mouse protein that binds to curved DNA, increases during cell proliferation and after UV irradiation. **Carcinogenesis**, 19:781-789, 1998.

KANNOUCHE, P.; MAUFFREY, P.; PINON-LATAILLADE, G.; MATTEI, M.G.; SARASIN, A.; DAYA-GROSJEAN, L.; ANGULO, J.F. Molecular cloning and characterization of the human Kin17 cDNA encoding a component of the UVC response that is conserved among metazoans. **Carcinogenesis**, 21:1701-1710, 2000.

KELLOGG, V. Insect Breeding. **Journal of Heredity**, 1:133-135, 1910.

IE MAIRE, A.; SCHILTZ, M.; STURA, E.A.; PINON-LATAILLADE, G.; COUPRIE, J.; MOUTIEZ, M.; GONDRIY, M.; ANGULO, J.F.; ZINN-JUSTIN, S. A tandem of SH3-like domains participates in RNA binding in kin17, a human protein activated in response to genotoxics. **Journal of Molecular Biology**, 364:764-776, 2006.

MARTINEZ, L.; ALMAGRO, J.C.; COLL, J.L.; HERRERA, R.J. Sequence variability in the fibroin-H intron of domesticated and wild silk moths. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 34:343-352, 2004.

MASSON, C.; MENAA, F.; PINON-LATAILLADE, G.; FROBERT, Y.; CHEVILLARD, S.; RADICELLA, J.P.; SARASIN, A.; ANGULO, J.F. Global genome repair is required to activate kin17, a UVC-responsive gene involved in DNA replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100:616-621, 2003.

MAZIN, A.; MILOT, E.; DEVORET, R.; CHARTRAND, P. Kin17, a mouse nuclear protein, binds to bent DNA fragments that are found at illegitimate recombination junctions in mammalian cells. **Molecular and General Genetics**, 244:435-438, 1994.

MAZIN, A.; TIMCHENKO, T.; MÈNISSIER-DE MURCIA, J.; SCHREIBER, V.; ANGULO, J.F.; DE MURCIA, G.; DEVORET, R. Kin17, a mouse nuclear zinc finger protein that binds preferentially to curved DNA. **Nucleic Acids Research**, 22:4335-4341, 1994b.

MICCOLI, L.; BIARD, D.S.F.; FROUIN, I.; Harper, F.; Maga, G.; Angulo, J.F. Selective interactions of human kin17 and RPA proteins with chromatin and the nuclear matrix in a DNA damage- and cell cycle-regulated manner. **Nucleic Acids Research**, 31:4162-4175, 2003.

MICCOLI, L.; FROUIN, I.; NOVAC, O.; DI PAOLA, D.; HARPER, F.; ZANNIS-HADJOPOULOS, M.; MAGA, G.; BIARD, D.S.; ANGULO, J.F. The human stress-activated protein kin17 belongs to the multiprotein DNA replication complex and associates in vivo with mammalian replication origins. **Molecular and Cellular Biology**, 25: 3814-3830, 2005.

NAGARAJU, J. Recent advances in molecular genetics of the silk moth, *Bombyx mori*; **Current Science**, 78:151-161, 2000.

NAGARAJU, J.; GOLDSMITH, M.R. Silkworm genomics - progress and prospects. **Current Science**, 83:411-425, 2002.

PARTHASARATHY, R.; GOPINATHAN, K.P. Comparative analysis of the development of the mandibular salivary glands and the labial silk glands in the mulberry silkworm, *Bombyx mori*. **Gene Expression Patterns**, 5:323-339, 2005.

PAULINO, A.T.; MINASSE, F.A.; GUILHERME, M.R.; REIS, A.V.; MUNIZ, E.C.; NAZAKI, J. Novel adsorbent based on silkworm chrysalides for removal of heavy metals from wastewaters. **Journal of Colloid and Interface Science**, 301:479-487, 2006.

RAPPSILBER, J.; RYDER, U.; LAMOND, A. I.; MANN, M. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. **Genome Research**, 12:1231-1245, 2002.

PINON-LATAILLADE, G.; MASSON, C.; BERNARDINO-SGHERRI, J.; HENRIOT, V.; MAUFFREY, P.; FROBERT, Y.; ARANEDA, S.; ANGULO, J.F. kin17 encodes an RNA-binding protein and is expressed during mouse spermatogenesis. **Journal of Cell Science**, 117: 3691-3702, 2004.

SENGUPTA, K.; KUMAR, P.; BAIG, M.; GOVINDAIAH. **Handbook on Pest and Disease Control of Mulberry and Silkworm**. Bangkok, Thailand: UNESCAP - United Nations Economic and Social Commission for Asia and the Pacific, 1990. 88p.

SERVOLI, E.; MANIGLIO, D.; MOTTA, A.; PREDAZZER, R.; MIGLIARESI, C. Surface properties of silk fibroin films and their interaction with fibroblasts. **Macromolecular Bioscience**, 5:1175-1183, 2005.

SREEKUMAR, S.; ASHWATH, S.K.; SLATHIA, M.; KUMAR, SN.; QADRI, S.M.H. Detection of a single nucleotide polymorphism (SNP) DNA marker linked to cocoon traits in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). **European Journal of Entomology**, 108:347-354, 2011.

STEINER, T.; KAISER, J.T.; MARINKOVIC, S.; HUBER, R.; WAHL, M.C. Crystal structures of transcription factor NusG in light of its nucleic acid- and protein-binding activities. **The EMBO Journal**, 21:4641-4651, 2002.

TAMURA, T.; THIBERT, C.; ROYER, C.; KANDA, T.; ABRAHAM, E.; KAMBA, M.; KOMOTO, N.; THOMAS, J.L.; MAUCHAMP, B.; CHAVANCY, G.; SHIRK, P.; FRASER, M.; PRUDHOMME, J.C.; COUBLE, P.; TOSHIKI, T.; CHANTAL, T.; CORINNE, R.; TOSHIO, K.; EAPPEN, A.; MARI, K.; NATUO, K.; JEAN-LUC, T.; BERNARD, M.; GERARD, C.; PAUL, S.; MALCOLM, F.; JEAN-CLAUDE, P.; PIERRE, C. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. **Nature Biotechnology**, 18:81-84, 2000.

TISSIER, A.; KANNOUCHE, P.; BIARD, D.S.; TIMCHENKO, T.; MAZIN, A.; ARANEDA, S.; ALLEMAND, I.; MAUFFREY, P.; FRELAT, G.; ANGULO, J.F. (1995). The mouse Kin-17 gene codes for a new protein involved in DNA transactions and is akin to the bacterial RecA protein. **Biochimie**, 77:854-860, 1995.

THOMAS, J.L.; DA ROCHA, M.; BESSE, A.; MAUCHAMP, B.; CHAVANCY, G. 3 x P3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm *Bombyx mori* L. from the embryonic stage onwards. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 32:247–253, 2002.

TOMITA, M.; MUNETSUNA, H.; SATO, T.; ADACHI, T.; HINO, R.; HAYASHI, M.; SHIMIZU, K.; NAKAMURA, N.; TAMURA, T.; YOSHIZATO, K. Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. **Nature Biotechnology**, 21:52 - 56, 2003.

WANG, Y.; KIM, H.J.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KAPLAN, D.L. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. **Biomaterials**, 27:6064-60682, 2006.

WANG, X.; HU, X.; DALEY, A.; RABOTYAGOVA, O.; CEBE, P.; KAPLAN, D.L. Nanolayer biomaterial coatings of silk fibroin for controlled release. **Journal of Controlled Release**, 121:190-199, 2007.

WANG, W.; GAO, J.; WANG, J.; LIU, C.; MENG, Y. Cloning, expression and enzymatic properties analysis of dihydrofolate reductase gene from the silkworm, *Bombyx mori*. **Molecular Biology Reports**, 39:10285-10291, 2012.

YANG, H.; LUO, S.; LI, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z. Identification and characterization of the DNA replication origin recognition complex gene family in the silkworm *Bombyx mori*. **Bioscience Reports**, 31:353-361, 2011.

YOSHITAKE, N. Phylogenetic aspects on the origin of Japanese race of the silkworm, *Bombyx mori* L. **The Journal of Sericultural Science of Japan**, 37:83-87, 1968

ZENG, T.; GAO, H.; YU, P.; HE, H.; OUYANG, X.; DENG, L.; ZHANG, Y. Up-regulation of kin17 is essential for proliferation of breast cancer. **Plos One**, 6(9):e25343, 2011.

ZHANG, Y.; CHEN, J.; LV, Z.; NIE, Z.; ZHANG, X.; WU, X. Can 29kDa rhGM-CSF expressed by silkworm pupae bioreactor bring into effect as active cytokine through orally administration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 28:212-223, 2006.

ZUROVEC, M.; YANG, C.; KODRÍK, D.; SEHNAL, F. Identification of a novel type of silk protein and regulation of its expression. **Biological Chemistry**, 25:15423-15428, 1998.