

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA
CAMPUS DE ARARAQUARA

CLONAGEM DE OXIDOESQUALENO CICLASES DE *Maytenus illicifolia* Mart. ex
Reissek (CELASTRACEAE)

THAÍS BARBONI ALVES

ORIENTADOR: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli
COORIENTADORA: Dra. Tatiana Maria de Souza Moreira

ARARAQUARA-SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA
CAMPUS DE ARARAQUARA

CLONAGEM DE OXIDOESQUALENO CICLASES DE *Maytenus Illicifolia* Mart Ex
Reissek (CELASTRACEAE)

THAÍS BARBONI ALVES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, do Instituto de
Química da Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia

ORIENTADOR: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

COORIENTADORA: Dra. Tatiana Maria de Souza Moreira

ARARAQUARA-SP

2013

THAÍS BARBONI ALVES

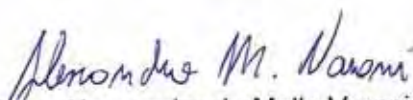
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 28 de junho de 2013.

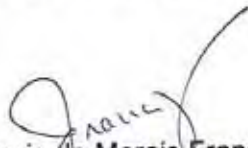
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli (Orientador)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal



Prof. Dr. Francis de Moraes Franco Nunes
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS – UFSCAR, São Carlos

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Valéria, meu pai Cleber (in memoriam) e à minha irmã Letícia, pelo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida

À minha mãe Valéria, ao meu pai Cleber, à minha irmã Letícia, pelo incentivo, apoio, carinho e amor que me auxiliaram em todos os momentos

À toda minha família e amigos. Aos meus avós, aos meus padrinhos Ana e Cecílio, ao Toninho e Rosângela, a Dona Jú, pelo apoio e carinho

Ao meu namorado Luiz Guilherme pelo incentivo e amor com o qual sempre me apoia

Ao professor Cleslei e a pos-doc Tatiana pelo apoio, orientação e oportunidade de crescimento

Aos amigos do laboratório Cristina, Priscila, Carol, Júlia, Matheus, Marco, Tuca, Hermano, Carol V., Paulinha, Natália, Fábio, Paulo, Oedem, Tatiana Watanabe, Danuza, Tatiana Maria, Daniella, Kadu, Victor e Mari pelo aprendizado, pela ajuda e contribuição na realização deste trabalho

Aos técnicos Sílvia e Luciano pelo apoio nas atividades do laboratório

Aos professores e todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para realização deste projeto e para minha formação

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas, ao Instituto de Química e CNPQ pelo apoio institucional e financeiro para realização deste projeto

RESUMO

A classe dos triterpenos pentacíclicos apresenta uma diversidade de estruturas que é devida ao número de rearranjos que a molécula do precursor oxidoesqualeno sofre durante a ciclização, sendo a friedelina o derivado com maior número de rearranjos. As oxidoesqualeno ciclases (OSCs) são enzimas que catalizam a biossíntese dos triterpenos, gerando essa variedade de estruturas. O objetivo deste estudo foi clonar OSCs a partir de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, uma espécie medicinal brasileira, para posterior análise funcional dos seus triterpenos pentacíclicos e localização filogenética em relação às OSC já caracterizadas de outras espécies. Para esta finalidade, adotou-se a estratégia de RT-PCR. O RNA total foi extraído a partir das folhas de *M. ilicifolia* e utilizado na síntese de cDNA. A amplificação de fragmentos “core” de genes de OSCs foi realizada com iniciadores parcialmente degenerados desenhados para amplificar regiões conservadas entre enzimas dessa família. Os fragmentos clonados foram sequenciados e iniciadores específicos foram desenhados para as amplificações das extremidades 5' e 3'. Posteriormente iniciadores específicos foram desenhados para clonagem dos cDNAs completos. Comparação com banco de dados revelou que uma das ORFs obtida possui alta identidade com cicloartenol sintases de outras espécies de plantas já caracterizadas e que outras três ORFs clonadas possuem alta identidade com triterpeno sintases como beta-amirina, lupeol e isomultiflorenol sintases. As ORFs clonadas serão utilizadas em estudos futuros para expressão por sistema heterólogo permitindo a identificação das oxidoesqualeno ciclases por meio de análise dos produtos gerados .

Palavras-chave: oxidoesqualeno ciclases, friedelina, *Maytenus ilicifolia*, triterpeno sintases

ABSTRACT

The class of pentacyclic triterpenes presents a diversity of structures due to the number of rearrangements that the molecule of oxidosqualene undergoes during cyclization, being friedelin the derivative with maximum number of rearrangements. The oxidosqualene cyclases (OSCs) are enzymes that catalyze the biosynthesis of triterpenes, generating a wide variety of molecules. This study aims to clone OSC from leaves of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, a medicinal species from Brazil, for further functional analysis of its pentacyclic triterpenes and phylogenetic localization in comparison of OSCs characterized from other species. For this purpose, we adopted the strategy of RT-PCR. Total RNA was extracted from leaves of *M. ilicifolia* and used in the synthesis of cDNA. The PCR amplification of core fragments of OSC genes was performed with partially degenerated primers designed to amplify highly conserved regions among this class of enzymes. The cloned fragments were sequenced and specific primers were designed for amplification of 5' and 3' ends. Then, specific primers were designed for amplification of full-length cDNAs. Phylogenetic analyzes revealed that TS6 showed high identity with cycloartenol synthase of several other plant species already characterized, and CS4 exhibit high identity to triterpene synthases as beta-amyrin, lupeol and isomultiflorenol synthases from other plant species. The ORFs cloned will be used in future studies for expression in heterologous system allowing identification of the oxidosqualene cyclases by analysis of the products generated.

Key Words: oxidosqualene cyclases, friedelin, *Maytenus ilicifolia*, triterpene synthase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Compostos bioativos derivados de plantas.	15
Figura 2. Rotas da biossíntese dos terpenoides.....	19
Figura 3. Vias de produção de esteroides em plantas, fungos e mamíferos e triterpenos pentacíclicos no metabolismo secundário de plantas utilizando 2,3-oxidoesqualeno como precursor em comum.....	20
Figura 4. Triterpenos pentacíclicos formados por rearranjo enzimático e ciclização da molécula de oxidoesqualeno.	21
Figura 5. O precursor friedelina e seus derivados quinonametídeos triterpênicos maitenina e pristimerina.	22
Figura 6. <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart ex Reissek.....	23
Figura 7. Estratégia de clonagem de OSCs de <i>M. ilicifolia</i>	27
Figura 8. Confirmação de RNA total e cDNAs obtidos	54
Figura 9. Amplificação de fragmentos “core” de oxidoesqualeno ciclases..	55
Figura 10. Estratégia de clonagem dos fragmentos “core” dos genes de OSCs das folhas de <i>M. ilicifolia</i>	57
Figura 11. Agrupamento dos fragmentos “core” obtido com o programa ClustalW2.	58
Figura 12. Amplificação de fragmentos da extremidade 3’ de oxidoesqualeno ciclases.....	60
Figura 13. Amplificação das extremidades 3’ dos cDNAs obtidos.....	61
Figura 14. Amplificação de fragmentos da extensão 5’ de oxidoesqualeno ciclases.	62
Figura 15. Amplificação dos fragmentos de extensão 5’ do core.	62
Figura 16. Amplificação de fragmentos da extremidade 5’ de oxidoesqualeno ciclases.....	63
Figura 17. Amplificação das extremidades 5’ dos cDNAs obtidos (RACE 5’).	64
Figura 18. Montagem virtual dos fragmentos “core” com os fragmentos da RACE 3’..	65
Figura 19. Montagem virtual dos fragmentos da extensão 5’ com os fragmentos core..	67

Figura 20. Montagem virtual dos fragmentos da extremidade 5' com os fragmentos da extensão 5'	68
Figura 21. Clonagem das ORFs de oxidoesqualeno ciclases.	72
Figura 22. Sequências de aminoácidos das OCSs de <i>M. ilicifolia</i>	74
Figura 23. Análise filogenética comparando as novas OSC clonadas de <i>M. ilicifolia</i>	77
Figura 24. Subclonagem das ORFs em pYES2 e confirmação das subclonagens...	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados na clonagem de fragmentos “core” de OSC e suas características principais.	32
Tabela 2. Iniciadores utilizados para clonagem dos fragmentos da extremidade 3’ do cDNA de OSCs e suas principais características.	39
Tabela 3. Iniciadores utilizados para clonagem dos fragmentos de extensão no sentido 5’ do “core” de OSCs e suas principais características.	40
Tabela 4. Iniciadores utilizados para clonagem dos fragmentos da extremidade 5’ do cDNA de OSCs e suas principais características.	41
Tabela 5. Iniciadores específicos “forward” e “reverse” utilizados para amplificação das ORFs de oxidoesqualeno ciclasas de <i>M. ilicifolia</i> e suas principais características.	45
Tabela 6. Iniciadores “forward” e “reverse” para sequenciamento das ORFs completas de oxidoesqualeno ciclasas de <i>M. ilicifolia</i>	47
Tabela 7. Sequências utilizadas nas análises filogenéticas.	48
Tabela 8. Dados da clonagem de fragmentos "core".	58
Tabela 9. Identidade entre as sequências de DNA dos fragmentos core de OSCs clonados de <i>M. ilicifolia</i>	59
Tabela 10. Dados das clonagens dos fragmentos obtidos para RACE 3’, extensão 5’ e RACE 5’.....	70
Tabela 11. Dados das clonagens das ORFs completas no vetor pTZ57R/T e análises realizadas das extremidades 5’ e 3’.	73

ABREVIATURAS

DMAPP - dimetilalil-pirofosfato

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – didesoxinucleotídeos

D.O. - densidade óptica

EDTA – ácido etileno diamino tetracético

g – grama

g – força centrífuga

IPP- isopentenil pirofosfato

IPTG - isopropil- β -D-tiogalactosídeo

L – litros

LiAc – acetato de lítio

M - molar

mg – miligrama

min – minutos

mM - milimolar

ng – nanograma

NCBI – “National Center for Biotechnology Information”

OSC - oxidoesqualeno ciclase

OMS - Organização Mundial da Saúde

ORF – “open reading frame”

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase

PEG - polietilenoglicol

pH – potencial hidrogeniônico

qPCR – PCR em tempo real

RACE – “rapid amplification of cDNA ends”

RNA – ácido ribonucleico

rRNA – RNA ribossômico

rpm – rotações por minuto

RT-PCR: transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase

s – segundo

μ g - micrograma

μ L – microlitros

UV – ultravioleta

V – volts

X-Gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galacto-piranosideo

°C – graus Celsius

YPD – meio de cultura constituído por extrato de levedura, peptone e dextrose

SUMÁRIO

RESUMO.....	0
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	0
LISTA DE TABELAS	0
ABREVIATURAS.....	10
SUMÁRIO.....	12
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Produtos Naturais Produzidos por Plantas	14
1.2. Metabolismo das plantas	16
1.3. Triterpenoides.....	17
1.4. <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart ex Reissek	22
1.5. Clonagem de Oxidoesqualeno Ciclases (OSCs)	24
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo Geral.....	28
2.2. Objetivos Específicos.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Material Vegetal	29
3.2. Extração de RNA total	29
3.3. Síntese de cDNA	30
3.3.1. Síntese de cDNA com o kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription”	30
3.3.2. Síntese de cDNA com kit 3’ RACE “System for Rapid Amplification of cDNA Ends”	31
3.4. Amplificação de fragmentos “core” de oxidoesqualeno ciclases.....	31
3.5. Clonagem dos fragmentos “core” obtidos	33
3.5.1. Purificação dos Produtos da PCR a partir do gel	33
3.5.2. Reação de ligação com o vetor	33
3.5.3. Preparo de células competentes	34
3.5.4. Transformação bacteriana	34
3.6. Análise dos clones recombinantes	35
3.6.1. PCR de colônias.....	35
3.6.2. Extração de DNA plasmidial.....	36
3.6.3. Digestão de DNA plasmidial.....	36
3.7. Sequenciamento	36
3.8. Análise <i>in silico</i> : programas computacionais utilizados	37
3.9. Amplificação Rápida das Extremidades 3’ do cDNA (RACE 3’)	37
3.9.1. Síntese do cDNA.....	38
3.9.2. Amplificação rápida das extremidades 3’ do cDNA (RACE 3’).....	38
3.10. Extensão dos fragmentos “core” no sentido 5’.....	40
3.11. Amplificação Rápida das Extremidades 5’ do cDNA (RACE 5’)	41
3.11.1. Síntese do cDNA.....	42
3.11.2. Purificação do cDNA	43
3.11.3. Adição de cauda poli-C ao cDNA.....	43
3.11.4. Amplificação das extremidades 5’ do cDNA.....	43
3.11.5. “Nested” PCR.....	44
3.12. Clonagem das ORFs de OSCs de <i>M. ilicifolia</i>	45

3.12.1. Desenho de iniciadores específicos para amplificação das ORFs de OSCs.....	45
3.12.3. Sequenciamento das ORFs de oxidoesqualeno ciclases.....	46
3.14. Subclonagem das ORFs no vetor pYES2.....	49
3.14.1. Digestão do vetor pYES2 e do inserto	50
3.14.2. Reação de Ligação	50
3.14.3. Transformação bacteriana	50
3.14.4. Análise dos clones recombinantes	51
3.15. Transformação de levedura	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1. Extração de RNA e Síntese de cDNA.....	53
4.2. Clonagem do fragmento “core”	55
4.3. Amplificação da extremidade 3’ do cDNA de OSCs	60
4.4. Extensão no sentido 5’ dos fragmentos “core”	61
4.5. Amplificação das extremidades 5’ dos cDNAs de OSCs	63
4.6. Montagem virtual dos fragmentos: “core” + RACE 3’.....	64
4.7. Montagem virtual dos Fragmentos: Extensão 5’ + “Core” + RACE 3’.....	66
4.8. Montagem virtual dos Fragmentos: RACE 5’ + Extensão 5’ + “Core” + RACE 3’.....	68
4.9. Amplificação das ORFs de oxidoesqualeno ciclases e clonagem no vetor pTZ57R/T.....	71
4.10. Sequenciamento completo das ORFs de oxidoesqualeno ciclases obtidas	72
4.11. Comparação de sequências de aminoácidos de CS4 e TS6 e suas relações com outros membros da superfamília das OSCs	75
4.12. Subclonagem das ORFs de oxidoesqualeno ciclases no vetor de expressão pYES2.....	77
5. CONCLUSÕES	79
6. REFERÊNCIAS.....	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos Naturais Produzidos por Plantas

Desde os tempos antigos, as plantas têm sido utilizadas pela humanidade como uma fonte valiosa de metabólitos com propriedades terapêuticas. Grande número das fármacos modernos foi desenvolvido a partir de plantas utilizadas pelas civilizações do Egito, China, Índia e Grécia (SHOEB, 2006). O papiro de Ébers, primeiro tratado médico conhecido da civilização egípcia, descreve receitas para o tratamento de doenças utilizando plantas como babosa, absinto, mirra, hortelã, entre outras (CORREA FILHO, 2008).

Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial utilizam produtos naturais para seus cuidados primários com a saúde e que mais de um terço dos fármacos aprovados no mercado são produtos naturais ou derivados destes (CAO e KINGSTON, 2009; CRAGG e NEWMAN, 2002). O uso de plantas desempenha um papel importante na saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento, onde muitas vezes, é o único recurso terapêutico disponível (MOSSI *et al.*, 2009)

O conhecimento etnobotânico-farmacológico acumulado por gerações serviu para o desenvolvimento de fármacos (Figura 1) de grande importância e valor comercial, tais como: o ácido acetil-salicílico (A), princípio ativo da Aspirina[®], composto modificado do ácido salicílico, isolado inicialmente de uma Salicaceae; a escopolamina (B), alcaloide isolado de Solanaceae e modificado constituindo o princípio ativo do Buscopan[®], medicamento analgésico recomendado para dores (FELIU, 2011); a vincristina (C) e vinblastina (D), isolados *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae), utilizados em combinação com outros quimioterápicos no tratamento de vários tipos de câncers (SHOEB, 2006); o paclitaxel (Taxol[®], E), isolado da planta *Taxus brevifolia* (Taxaceae), que apresenta atividade clínica excelente contra câncer de ovário e de pulmões (CHAUDHARY *et al.*, 1994); e a artemisinina (F) presente na espécie *Artemisia annua*, que exerce potente atividade antimalárica (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

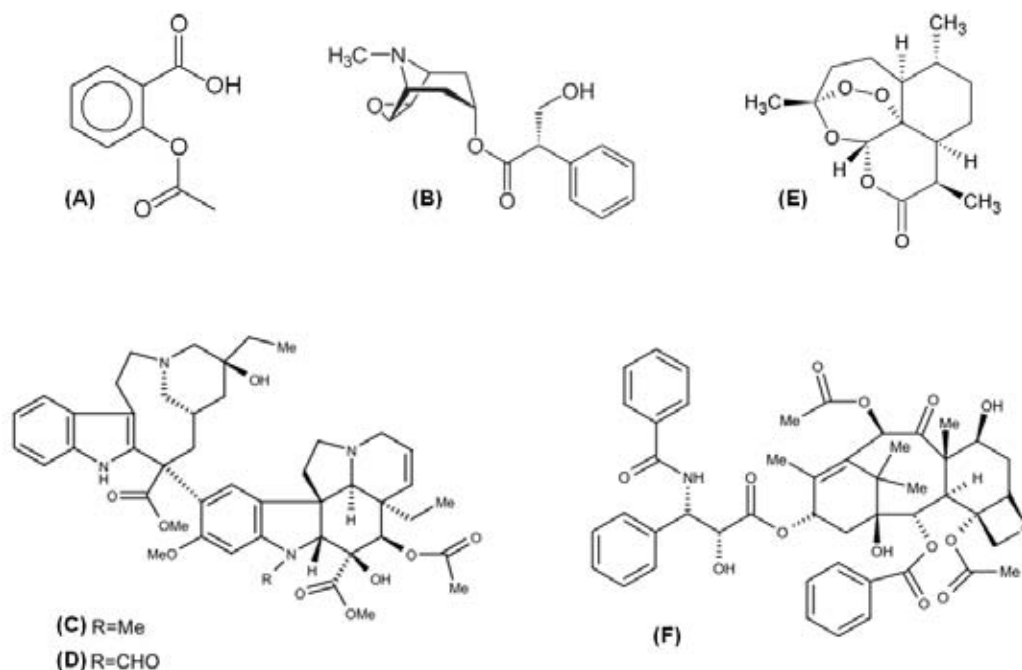


Figura 1. Compostos bioativos derivados de plantas. (A) ácido acetil-salicílico; (B) escopolamina; (C) vincristina; (D) vinblastina, isolados *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae), utilizados em combinação com outros quimioterápicos no tratamento de vários tipos de câncers (SHOEB, 2006); o paclitaxel (Taxol®, E), isolado da planta *Taxus brevifolia* (Taxaceae), que apresenta atividade clínica excelente contra câncer de ovário e de pulmões apresentando-se como uma promessa de boa atividade no tratamento de outras neoplasias (CHAUDHARY *et al.*, 1994) e a artemisinina (F).

Mesmo com o grande número de espécies utilizadas pela medicina tradicional, apenas a partir dos anos 1990, os estudos relacionados a descoberta dos produtos naturais de plantas começaram a receber um interesse crescente objetivando principalmente fármacos com efeitos anticâncer e contra processos inflamatórios (PINTO e REZENDE, 2003). Ainda nos anos 90, cerca de 75% dos compostos naturais utilizados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo recomendações da medicina popular (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

A maioria das espécies vegetais é desconhecida do ponto de vista científico, sendo que apenas 5%, das 250-500 mil espécies existentes no planeta, foram estudadas quimicamente e menos de 5% foram testadas biologicamente (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998). Estima-se que no Brasil, apenas 10% das plantas foram estudadas do ponto de vista químico e farmacológico (VEPOORTE *et al.*, 2000), de modo que ainda há muito trabalho a ser feito em relação à descoberta e desenvolvimento dos produtos naturais devido à grande diversidade de plantas existentes (NODARI E GUERRA, 2001). O estudo dos produtos naturais de plantas

justifica-se devido à importância que assume na descoberta de várias substâncias com aplicação na medicina, agricultura, indústria de matérias e outras áreas (CORREA FILHO, 2008).

1.2. Metabolismo das plantas

Metabolismo pode ser definido como o conjunto de reações químicas que ocorrem continuamente nas células, sendo divididas em catabolismo (reações de degradação), anabolismo (reações de síntese) e biotransformação (CORREA FILHO, 2008). No caso das células vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em primário e secundário.

A maioria dos compostos presentes nas plantas faz parte do metabolismo primário, como por exemplo, os polissacarídeos, açúcares simples, lipídeos, proteínas, entre outras moléculas, que são essenciais para o seu desenvolvimento e sobrevivência (MARASCHIN e VERPOORTE, 1999). Por outro lado, os compostos do metabolismo secundário, apesar de nem sempre serem necessários para que uma planta complete seu ciclo de vida, apresentam um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente (efeito atrativo de agentes polinizadores, repulsivo a microrganismos, insetos ou vertebrados, ou até mesmo à germinação de outras plantas em locais próximos) garantindo, muitas vezes, a sobrevivência das espécies no ecossistema (SANTOS, 2000).

A diversidade de metabólitos secundários de plantas é uma questão de grande interesse e importância, uma vez que esses produtos naturais, inclusive com estrutura muito semelhante, apresentam distintas atividades biológicas (PUPO *et al.*, 2007). A grande heterogeneidade de metabólitos secundários existente na natureza é geralmente derivada de modificações em estruturas comuns, que após a biossíntese são submetidas a reações de hidroxilação, ciclização, glicosilação, metilação, prenilação, acetilação, sulfatação e bezoilação. Nos últimos anos, diversas enzimas modificadoras, como oxidases, aciltransferases e metiltransferases foram clonadas e caracterizadas (MAURY *et al.*, 2005).

Os principais grupos de metabólitos secundários, tanto em número de compostos como em importância farmacológica e ambiental, são os alcaloides, os compostos fenólicos e os terpenoides (FELIU, 2011). Os alcaloides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido

chiquímico e, também, de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). Os compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila e são derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico (CORREA FILHO, 2008). Por fim, os terpenos, metabólitos de interesse nesse estudo, são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou a partir do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). respectivamente, a via do mevalonato e a do metileritritol têm como produtos finais os terpenos e os esteroides, sendo considerado o grupo mais complexo e diversificado dos metabólitos secundários (JAKIEMIU, 2008).

Os terpenos formam o maior grupo de compostos naturais encontrados em plantas e são constituídos por moléculas sucessivamente condensadas de isopreno. Entre os terpenoides, os triperpenoides têm sido relatados como o único grupo de compostos fitoquímicos com variadas atividades anticâncer e que têm demonstrado promissores resultados em estudos pré-clínicos.

Apesar da grande importância e alto valor econômico desses biofarmacos, baixos níveis de produtividade têm sido usualmente encontrados nos sistemas de produção agrícolas convencionais, devido a vários motivos, como o tempo necessário para o desenvolvimento da planta ou a necessidade de condições ideais para o cultivo (VERPOORTE et al., 2002). Com isso, surge a necessidade de sistemas alternativos de produção dessas biomoléculas e a produção em sistema heterólogo apresenta-se como um sistema com alto potencial para superação desse problema (VERPOORTE e MEMELINK, 2002).

1.3. Triterpenoides

Terpenoides representam o maior e mais diverso grupo de moléculas de plantas e estão presentes tanto como metabólitos primários como secundários (THOLL e LEE, 2011). Enquanto metabólitos primários, os terpenos apresentam importantes funções, como na fotossíntese, respiração, regulação do metabolismo hormonal, regulação do crescimento e desenvolvimento, na definição de estruturas de membrana, entre outras (MAURY et al., 2005). Já como metabólitos secundários, os derivados terpênicos podem ocorrer ou ser classificados como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e saponinas (SANTOS, 2004). Esses metabólitos secundários podem apresentar funções especializadas em interações

ecológicas, por exemplo, como fitoalexinas na defesa contra patógenos de plantas ou atuarem diretamente na defesa contra herbívoros (THOLL e LEE, 2011; XUE, *et al.*, 2012). Além disso, são de grande interesse devido às variadas propriedades farmacológicas que suas estruturas apresentam, por exemplo: os anticâncers paclitaxel de *Taxus* spp e vincristina/vimblastina de *Catharanthus roseus*; o antimalárico artemisinina de *Artemisia annua*; e o antirretroviral calanolide A de *Calophyllum lanigerum* (CRAGG e NEWMAN, 2005).

Os terpenos são sintetizados a partir da via do mevalonato ou a partir da via do fosfato de metileritritol. A partir da via do mevalonato, que ocorre no citosol e está presente em todos os organismos, são sintetizados sesquiterpenos, triterpenos e esteroides. Por outro lado, a partir da via do metileritritol, que ocorre nos cloroplastos e outros plastídeos e está presente em algumas bactérias, algas e plantas, são sintetizados monoterpênos, diterpenos e carotenoides (FELIU, 2011; MAURY, *et al.*, 2005). A Figura 2 esquematiza estas vias. Na via do mevalonato, ocorrem várias reações para formar a unidade básica dos terpenos, o isopentenil pirofosfato (IPP), que pode ser isomerizado em dimetilalil-pirofosfato (DMAPP). Na via do fosfato de metileritritol, o gliceraldeído-3-fosfato e dois átomos de carbono derivados do piruvato se combinam para formar um intermediário que é convertido em IPP ou DMAPP (FELIU, 2011). Por sua vez, o IPP ou seu isômero, o DMAPP, unem-se para formar moléculas maiores. Inicialmente, o IPP e o DMAPP reagem e formam o geranyl-pirofosfato (GPP, C₁₀), a partir do qual são formados os monoterpênos (JAKIEMI, 2008). O GPP pode, então, ligar-se a outra molécula de IPP e formar farnesil-difosfato (FPP, C₁₅), precursor da maioria dos sesquiterpenos. A adição de outra molécula de IPP forma o geranylgeranyl-pirofosfato (GGPP, C₂₀), precursor dos diterpenos. Finalmente, FPP e GGPP podem dimerizar formando triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀), respectivamente. Os esteroides são sintetizados posteriormente, a partir dos triterpenos (JAKIEMI, 2008; MAURY *et al.*, 2005).

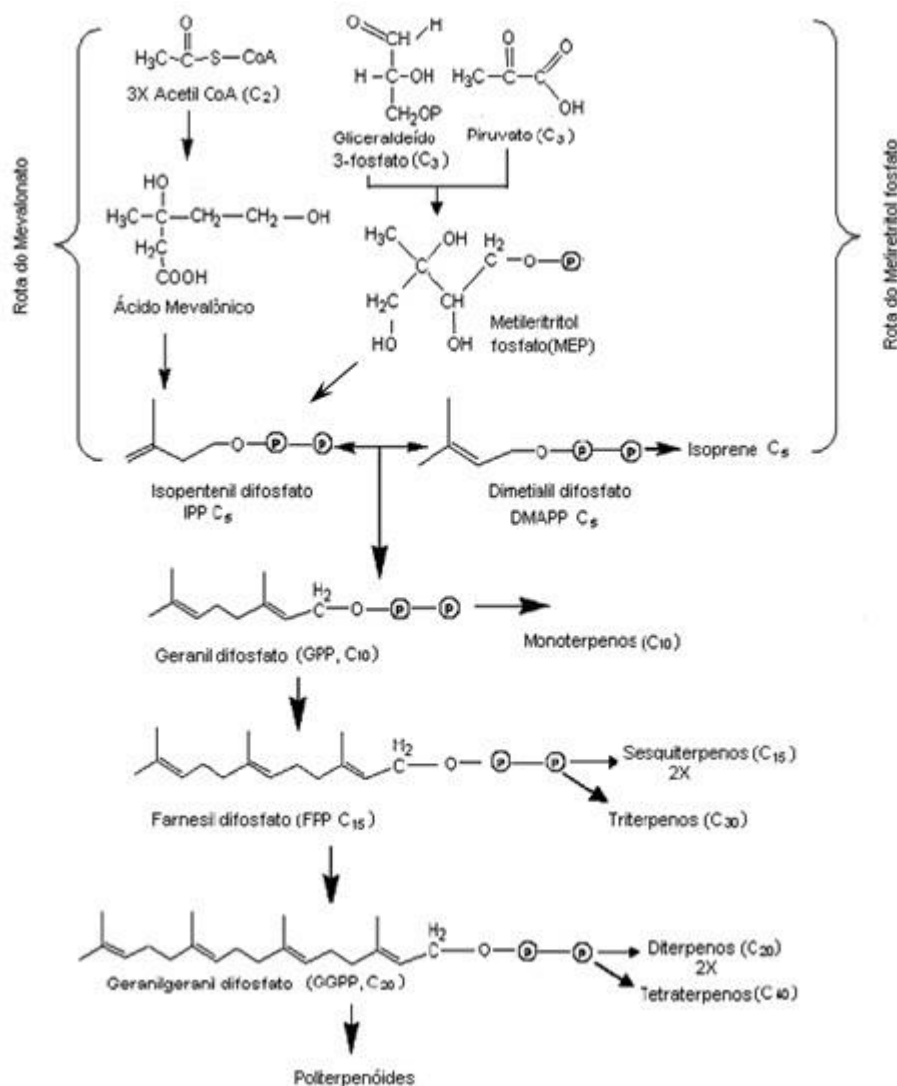


Figura 2. Rotas da biossíntese dos terpenoides (JAKIEMIU, 2008).

A síntese de esteroides do metabolismo primário de plantas envolve a ciclização do 2,3-oxidoesqualeno em cicloartenol, por uma enzima da família das oxidoesqualeno ciclases, a cicloartenol sintase (Figura 3). O 2,3-oxidoesqualeno pode ser ciclizado, também, por oxidoesqualeno ciclases (OSC) do metabolismo secundário, as triterpeno sintases, gerando diversos triterpenos pentacíclicos, sendo o mais comum deles a β -amirina (HARALAMPIDIS *et al.*, 2001). As enzimas OSCs catalizam a reação competindo pelo mesmo substrato para gerar produtos específicos, direcionando o fluxo da via metabólica para produção de esteroides ou triterpenoides (GUHLING, *et al.* 2005).

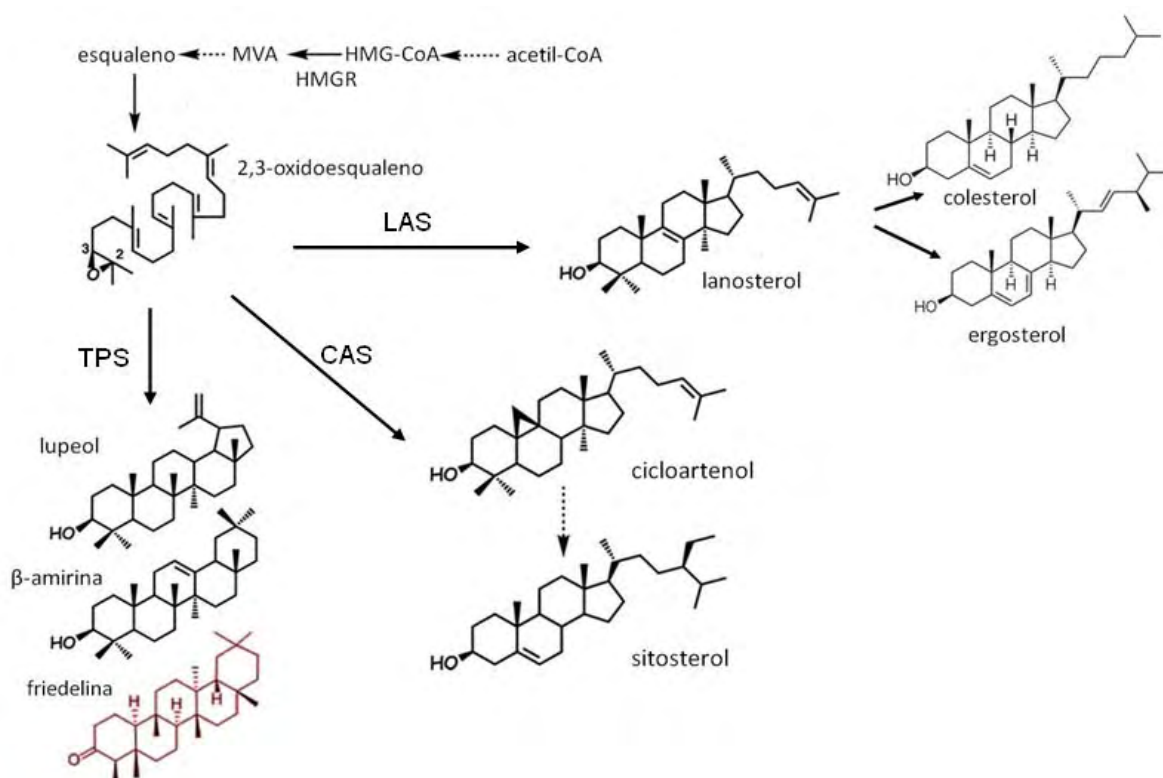


Figura 3. Vias de produção de esteroides em plantas, fungos e mamíferos e triterpenos pentacíclicos no metabolismo secundário de plantas utilizando 2,3-oxidoesqualeno como precursor em comum. HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA; MVA: mevalonato; LAS: lanosterol sintase; CAS: cicloartenol sintase; TPS: triterpeno pentacíclico sintases (BABYCHUK et al., 2008).

A molécula de 2,3-oxidoesqualeno sofre diversos rearranjos após o fechamento dos anéis, sendo o derivado com menor número de rearranjos o germanicol e, a friedelina, o derivado com maior número de rearranjos, como pode ser visto na Figura 4 (WANG et al., 2010). Friedelina é um dos derivados triterpenoídicos de interesse terapêutico, visto que diferentes estudos comprovaram variadas atividades biológicas para o composto puro ou em fração enriquecida (KUETE et al., 2007; DURAIPANDIYAN et al., 2010).

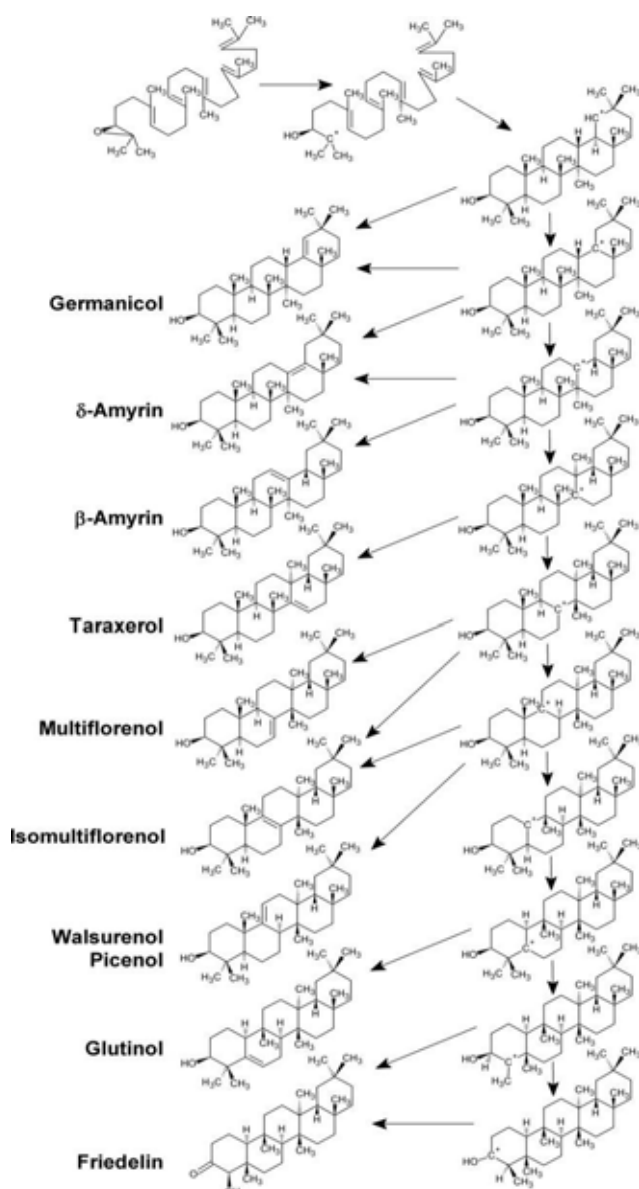


Figura 4. Triterpenos pentacíclicos formados por rearranjo enzimático e ciclização da molécula de oxidoesqualeno (WANG *et al.*, 2010).

Além disso, friedelina é a molécula precursora dos quinonametídeos triterpênicos maitenina e pristimerina (Figura 5). Foi demonstrado que friedelina está presente nas folhas das espécies *Maytenus* spp e *Salacia campestris* e que a síntese dos quinonametídeos triterpênicos é compartimentalizada na casca das raízes jovens destas plantas (CORSINO *et al.*, 2000). Os quinonametídeos triterpênicos são metabólitos restritos às famílias Celastraceae e Hippocrateaceae e apresentam diversas atividades biológicas como anticâncer, antimicrobiana e antimalárica (SANTOS-OLIVEIRA *et al.*, 2009), sendo, portanto, de grande interesse a sua produção em maior escala e de forma a evitar o extrativismo predatório das espécies vegetais envolvidas.

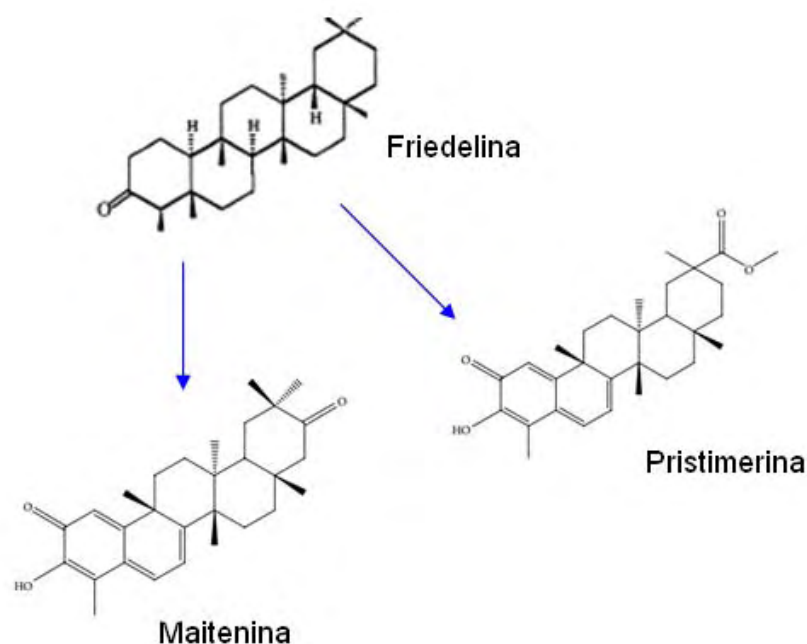


Figura 5. O precursor friedelina e seus derivados quinonametídeos triterpênicos maitenina e pristimerina.

1.4. *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek

A espécie medicinal *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek (Figura 6) é popularmente conhecida como “espinheira-santa”, “cancrosa de sete-espinhos”, “maiteno”, “espinho-de-Deus”, “salva-vidas”, “sombra-de-touro”, “coromilho-do-campo” entre outros nomes (LORENZI e MATOS, 2002). Até recentemente, a nomenclatura botânica utilizada era *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, porém essa espécie foi reclassificada e seu nome oficial aceito atualmente passou a ser *Maytenus officinalis* Mabb. (CARVALHO, 2011).

A espécie pertence à família Celastraceae, a qual compreende aproximadamente 55 gêneros e 850 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais. O gênero *Maytenus* é um dos maiores na família Celastraceae, com cerca de 77 espécies relatadas na flora brasileira (CARVALHO, 2011). No Brasil, esta espécie pode ser encontrada nas regiões Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul), Sudeste (São Paulo) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Também pode ser encontrada no Paraguai, Bolívia, Uruguai e Argentina (GUTIÉRREZ *et al.*, 2007).

É um arbusto ou árvore (Figura 6), perene, ramificada desde a base, medindo até cinco metros de altura. As folhas apresentam dentes espinhosos nas margens,

cerca de 9 a 14 unidades por folha, dispostas mais frequentemente na metade apical foliar. A floração ocorre entre os meses de setembro a dezembro e a frutificação ocorre entre os meses de outubro a fevereiro, originando frutos de coloração vermelho-alaranjado (CARVALHO, 2011).



Figura 6. *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek: A) Folhas; B) Folhas e flores; C) Frutos e ramos, e D) Porte da árvore (Fonte: Lorenzi e Matos, 2002).

Na família Celastraceae, diversas substâncias com atividades biológicas já foram isoladas como, por exemplo, os maitansinóides e poliésteres sesquiterpênicos com atividade anticâncer, os quinonametídeos triterpênicos e dímeros triterpênicos com atividade citotóxica e diversas outras substâncias com atividade repelente e imunossupressora (MUNOZ et al., 1995).

M. ilicifolia é tradicionalmente utilizada por suas propriedades analgésica, antiulcerogênica, antisséptica, cicatrizante, diurética, laxativa e, estudos recentes afirmam que a espécie possui atividades anticâncer e antimicrobiana (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2009).

O primeiro relato sobre os efeitos terapêuticos da espinheira-santa ocorreu na década de 20, quando se mostrou eficaz no tratamento de úlceras gástricas. Em

2002, Queiroga e colaboradores comprovaram o efeito sinérgico entre os componentes de *M. ilicifolia*, ao demonstrar que o efeito antiulcerogênico dos taninos é potencializado na presença dos óleos essenciais, friedelina e friedelanol.

Friedelina, encontrada nas folhas, apresentou atividade antifúngica contra *Curvularia lunata*, *Trychophyton rubrum*, *Trychophyton simii*, *Aspergillus niger* e *Epidermophyton floccosum* e *Candida albicans* foi ativa contra bactérias gram-positivas (*Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e diferentes espécies de *Bacillus*) e gram-negativas (como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Shyella dysenteriae* e *Shyella flexneri*) (KUETE *et al.*, 2007; DURAIPANDIYAN *et al.*, 2010) e apresentou moderada atividade contra as linhagens celulares neoplásicas P388 de leucemia linfocítica murina, HL60 de leucemia humana e LL2, carcinoma de pulmão de Lewis (PILLAI MANOHARAN *et al.*, 2007). Já seus derivados quinonametídicos maitenina e pristimerina, encontrados nas raízes das espécies de *Maytenus*, demonstraram atividades antioxidante, anti-inflamatória e inibiram a proliferação de tumores (CORSINO *et al.*, 2000; CORSINO *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2010), recebendo especial atenção como promissores agentes anticarcinogênicos (PETRONELLI *et al.*, 2009; SANTOS-OLIVEIRA *et al.*, 2009; TIEDEMANN *et al.*, 2009).

Recentemente, a importância do uso popular e comprovação das suas propriedades terapêuticas fez com que o Ministério da Saúde incluísse a espécie na lista de medicamentos fitoterápicos distribuídos à população por meio do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2007).

1.5. Clonagem de Oxidoesqualeno Ciclases (OSCs)

As 2,3-oxidoesqualeno ciclases (OSCs) formam uma importante superfamília de enzimas que promovem a ciclização do 2,3-oxidoesqualeno, formando esteroides (metabolismo primário) ou triterpenos pentacíclicos (metabolismo secundário) (HARALAMPIDIS *et al.*, 2001).

Enquanto o genoma de plantas como *Chlamydomonas reinhardtii* e musgos (*Physcomitrella patens*) apresentam apenas um gene de OSC, necessária para a biossíntese de esteroides, plantas espermatófitas apresentam cerca de nove a dezesseis genes de OSCs. Acredita-se que genes de OSCs envolvidos na

biossíntese de triterpenos são derivados, direta ou indiretamente, de um gene ancestral de cicloartenol sintase (CS), que é essencial para biossíntese de esterol em plantas (XUE et al., 2012).

A primeira OSC clonada de uma planta foi uma cicloartenol sintase (CS) de *Arabidopsis thaliana*, utilizando a estratégia de expressão heteróloga, na qual uma biblioteca de cDNA foi introduzida em uma levedura mutante, incapaz de converter 2,3-oxidoesqualeno em lanosterol, e os clones foram então selecionados através da capacidade de converter oxidoesqualeno em cicloartenol (COREY et al., 1993).

Uma maneira alternativa para a clonagem de genes de OSCs de uma espécie com genoma desconhecido, sem necessidade de construção de bibliotecas de cDNA representando seu transcriptoma completo, seguido de sondagens, pode ser feita por meio da transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR), utilizando oligonucleotídeos iniciadores gerados a partir da comparação das sequências conhecidas de genes de enzimas da mesma família (McPHERSON e MOLLER, 2006; FARREL, 2010).

A identificação de regiões conservadas por meio de alinhamento múltiplo entre sequências de proteínas da mesma família pode ser utilizada para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores pela conversão da sequência de aminoácidos em nucleotídeos, utilizando-se um alfabeto de nucleotídeos degenerados (EDWARDS, 1995; PRESTON, 1999). Como muitos aminoácidos codificam mais que um códon, a abordagem mais segura é desenhar iniciadores que representem todos os possíveis códons para cada aminoácido, porém, iniciadores com grande degeneração podem anelar em outros genes e para reduzir essa desvantagem, os iniciadores podem ser desenhados considerando os códons preferenciais exibidos pela espécie (PRESTON, 1999). Outra possibilidade vantajosa para o desenho de iniciadores degenerados consiste em selecionar regiões da proteína que apresentem aminoácidos com poucas opções de códons (metionina e triptofano, representados por um códon; cisteína, ácido aspártico, ácido glutâmico, fenilalanina, histidina, lisina, glutamina e tirosina, representados por dois códons) e evitar regiões que contenham os aminoácidos leucina, arginina e serina, que são representados por seis diferentes códons (McPHERSON e MOLLER, 2006).

Neste trabalho, foram utilizados iniciadores parcialmente degenerados direcionados para amplificação de regiões altamente conservadas de oxidoesqualeno ciclases de plantas. Esses iniciadores foram descritos por Guhling et

al. (2006) para clonagem de uma lupeol sintase de *Ricinus communis* e foram utilizados também por Wang et al. (2010) para clonagem de diferentes oxidoesqualeno ciclases, entre elas a friedelina sintase, de *Kalanchoe draigremontiana*, sendo esta a única friedelina sintase clonada até o momento.

Com os iniciadores degenerados são amplificados apenas fragmentos denominados “core” das janelas de leitura (“open reading frames”, ORFs) dos genes de OSCs. Para a obtenção das ORFs completas, são necessários iniciadores gene específicos, desenhados de acordo com as diferentes sequências “core” obtidas (Figura 7). A partir destes iniciadores, são realizadas as extensões no sentido 5’ e 3’ do fragmento “core” utilizando o sistema de amplificação rápida das extremidades de um cDNA (Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE) (FARREL, 2010) .

Desta forma, o presente estudo utilizou as técnicas de RT-PCR para a clonagem dos genes transcritos de oxidoesqualeno ciclases das folhas de *M. ilicifolia* empregando iniciadores baseados no alinhamento das sequências de enzimas já conhecidas dessa superfamília restringindo à clonagem destes genes.

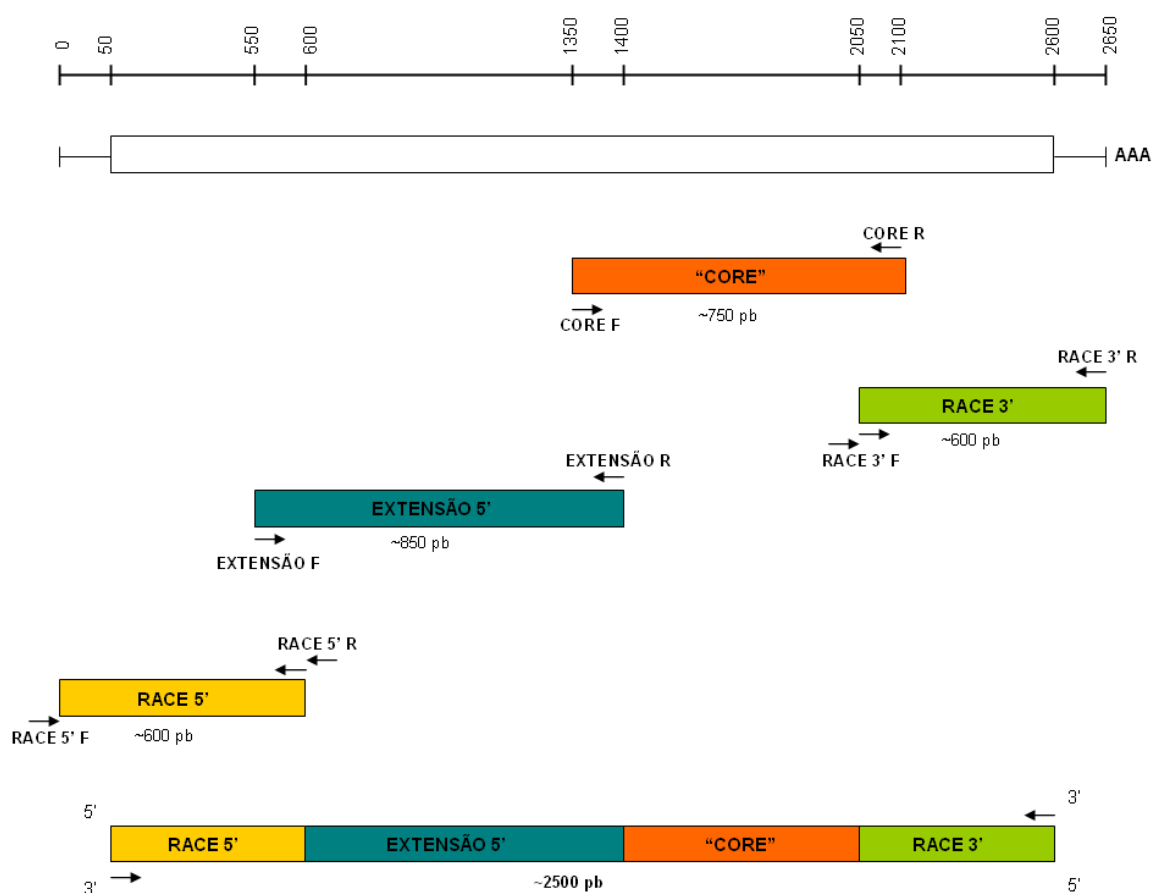


Figura 7. Estratégia de clonagem de genes de OSCs de *M. ilicifolia*, representado na escala de 0 a 2650 pb. A caixa branca representa a região codificadora do mRNA, e as linhas representam as regiões 5' e 3' não codificadoras. A posição e direção de cada iniciador são indicadas pelas setas. As caixas coloridas indicam os fragmentos de cDNA amplificados por cada PCR.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Clonagem dos cDNAs das enzimas oxidoesqualeno ciclases expressos nas folhas de *Maytenus ilicifolia*, em especial da enzima friedelina sintase.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Extração de RNA total a partir de folhas frescas;
- b) Síntese de cDNA e amplificação do “core” de genes de oxidoesqualeno ciclases utilizando oligonucleotídeos iniciadores parcialmente degenerados;
- c) Clonagem e sequenciamento dos fragmentos obtidos para determinação de iniciadores específicos;
- d) Amplificação das extremidades 3’ e 5’ dos fragmentos “core” por PCR com iniciadores específicos e com uso de sistema de adaptadores universais às extremidades (Rapid Amplification of cDNA Ends - RACE);
- e) Determinação dos iniciadores específicos que permitam a clonagem dos diferentes genes completos de oxidoesqualeno ciclases;
- f) Comparação entre as sequências de aminoácidos das enzimas obtidas com outras enzimas da família das oxidoesqualeno ciclases já descritas e caracterizadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Amostras de folhas da espécie *Maytenus ilicifolia* foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas na UNESP Campus de Araraquara e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido.

3.2. Extração de RNA total

As folhas congeladas foram trituradas em gral, com auxílio de pistilo (ambos previamente tratados para remoção de RNases) e aproximadamente 100 mg de material triturado foram utilizados para extração do RNA total utilizando “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen). O material vegetal foi transferido para tubos de microcentrifuga de 2 mL, onde foram adicionados 450 µL do tampão de lise a base de hidrocloreto de guanidina (RCL) contendo β-mercaptoetanol e, em seguida, o tubo foi agitado em um vórtex. O material lisado foi transferido para uma coluna de separação acoplada sobre um tubo coletor e centrifugado por 2 minutos na máxima velocidade, à temperatura ambiente. O sobrenadante do filtrado foi transferido para um tubo de centrífuga de 1,5 mL e misturado imediatamente por pipetagem com meio volume de etanol 96-100%. A mistura foi transferida para uma coluna de purificação acoplada sobre um tubo coletor. Após centrifugação por 15 segundos a 8.000 x *g*, o filtrado foi descartado, foram adicionados 700 µL do tampão RW1 na coluna e nova centrifugação foi realizada. O filtrado foi descartado e foram adicionados 500 µL do tampão RPE na coluna de purificação, centrifugando o tubo por mais 15 segundos a 8.000 x *g*. O filtrado foi descartado e novamente o tampão RPE foi adicionado, centrifugando o tubo por 2 minutos. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor e centrifugada por 1 minuto a 16.100 x *g*, para remoção de resíduos do tampão RPE. A coluna foi colocada em um novo tubo de microcentrifuga de 1,5 mL, foram adicionados 30 µL de água livre de RNase diretamente na membrana da coluna de purificação e o tubo foi centrifugado por 1 minuto a 8.000 x *g* e a centrifugação foi repetida com os mesmos 30 µL filtrados.

Uma alíquota diluída de RNA extraído foi utilizada para quantificação em espectrofotômetro (DU 800 Spectrophotometer – Beckman Coulter) nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm, observando-se a relação entre 260/280 e 260/230. A qualidade do RNA extraído também foi verificada por eletroforese desnaturante em gel de agarose 1,2% em TAE 1X (0,04 M Tris-acetato, 1 mM EDTA, água Milli-Q), o qual também foi usado como tampão de corrida. Para a eletroforese, foi aplicada uma solução contendo aproximadamente 3 µg do RNA extraído, 60% (v/v) de formamida, 1X RNA loading buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,25% de azul de bromofenol, 60% glicerol) e 1 µL de brometo de etídeo (1 mg/mL). A amostra foi incubada por 5 minutos a 65° C, em seguida incubada em banho de gelo por 5 minutos e submetida à eletroforese com voltagem constante de 5 V/cm (FARRELL, 2010). Após a corrida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com o sistema de gel documentação “INGENIUS” (Syngene).

3.3. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com o kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems) o qual utilizada iniciadores randômicos e a transcriptase reversa Multiscribe® (MMLV) e, também, com o kit 3’ RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen) o qual utiliza um iniciador constituído por um oligo(dT) ligado a uma sequência de nucleotídeos adaptadora e a transcriptase reversa SuperScript™ II (MMLV).

3.3.1. Síntese de cDNA com o kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription”

A síntese do cDNA foi realizada com o kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems) seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. O volume final da reação foi de 25 µL, sendo utilizados 5 µg do RNA total. Em um tubo de 200 µL foram adicionados: 5 µL de tampão RT (10X), 5 µL de RT random primers (10X), 2 µL de dNTPs (100 mM), 3 µL da enzima MultScribe Reverse Transcriptase (50 U/µL), 5 µg do RNA extraído e água H₂O Milli-Q

autoclavada para um volume final de 25 μ L. A reação foi incubada em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com a seguinte ciclagem: 25° C por 10 min, 37° C por 120 min e 85° C por 5 s (FARREL, 2010).

3.3.2. Síntese de cDNA com kit 3' RACE "System for Rapid Amplification of cDNA Ends"

A síntese do cDNA com o kit 3' RACE "System for Rapid Amplification of cDNA Ends" (Invitrogen) foi realizada seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. Em um tubo de 0,5 mL, foram adicionados cerca de 5 μ g de RNA total e um volume de água livre de nucleases suficiente para ajustar o volume final em 11 μ L. Foi adicionado 1 μ L de iniciador AP (10 μ M) (Tabela 2C), o tubo foi centrifugado brevemente, incubado a 70° C por 10 min e resfriado no gelo por 1 min. Foram adicionados e misturados os seguintes reagentes: 2 μ L do tampão 10X da PCR (20 mM Tris-HCl (pH 8,4 a 22° C); 50 mM KCl); 2 μ L de $MgCl_2$ (25 mM); 1 μ L de dNTPs (10 mM) e 2 μ L de DTT (0,1 M). Após homogeneização da solução, o tubo foi incubado a 42° C por 5 min. Em seguida, foi adicionado 1 μ L da transcriptase SuperScript™ II (200 U/ μ L) e o tubo incubado a 42° C por 50 min. A reação foi incubada a 70° C por 15 min e resfriada no gelo. Foi então, adicionado e misturado 1 μ L de RNase H (2 U/ μ L) e a reação incubada a 37° C por 20 minutos.

3.4. Amplificação de fragmentos "core" de oxidoesqualeno ciclases

Neste trabalho, para amplificação dos fragmentos "core" foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores degenerados, baseados em regiões conservadas da família das OSCs, descritos na literatura (GUHLING et al., 2006), bem como também foram desenhados outros iniciadores degenerados, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores utilizados na clonagem de fragmentos “core” de OSC e suas características principais.

Iniciador	Tamanho (nucleotídeos)	T _m (°C)	Sequência 5' – 3'
		Média	
VZO1035 ^a (F) *	23	54,9	TAYAATGGMAGYCARYTVTGGGA
VZO1036 ^a (R) *	20	54,3	TRRCTYTTCHCYCCAHCACC
VZO1037 ^b (F) *	21	57,1	TTYGGNWWGYCARNHRTGGGAT
VZO1038 ^b (R) *	22	61,7	TRRCTYTTCHCCCCAHCACCAT
VZO1040 ^c (F)	22	66,7	CARWAYTDDGAYGGNGGNTGGG
VZO1041 ^c (F)	21	60,9	CARAAYGARGAYGGNGGNNTGG
VZO1042 ^c (R)	21	45,4	RAANSWYTGDATYTTTCATNCC

Pares de iniciadores com maior especificidade para amplificação de genes de: ^acicloartenol sintase (VZO1035F e VZO1036R); ^btriterpenos sintases (VZO1037F e VZO1038R) e; ^coxidoesqualeno ciclases em geral (VZO1040F e VZO1041F ou VZO1042R). * Iniciadores degenerados descritos por Guhling et al. (2006).

As amostras de cDNA sintetizadas com os kits foram empregadas como molde nas reações de amplificação da porção “core” de genes codificadores de enzimas oxidoesqualeno ciclases (OSCs) de *M. ilicifolia*.

As reações de PCR foram preparadas em uma solução geral contendo: 0,5 µL de cada iniciador (50 µM); 0,5 µL de dNTPs (10 mM); 2,0 µL de MgCl₂ (50 mM); 2,5 µL de tampão para *Taq* DNA Polimerase (10X; contendo 100 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM (NH₄)₂SO₄ e 0,1% (v/v) Tween[®] 20); 0,5 µL da enzima *Taq* DNA Polimerase (5U/µL; Fermentas), 0,5 µL de cDNA e H₂O Milli-Q autoclavada para um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em termociclador com a seguinte condição: “hot start” a 94° C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94° C por 45 s, 50° C por 60 s e 72° C por 90 s, com uma extensão final a 72° C por 10 min.

Os resultados das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) em TAE 1X, o qual também foi usado como tampão de corrida. O gel foi submetido a voltagem constante de 5 a 9,0 V/cm (RAPLEY, 1999), visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com o sistema de gel documentação “INGENIUS”.

3.5 Clonagem dos fragmentos “core” obtidos

Após obtenção de fragmentos de DNA do tamanho desejado, procedeu-se à clonagem em vetor plasmidial. Posteriormente, a clonagem dos fragmentos foi confirmada pelo método de PCR de colônia e digestão plasmidial.

3.5.1. Purificação dos Produtos da PCR a partir do gel

A purificação dos fragmentos de DNA a serem clonados foi realizada a partir de gel de agarose com auxílio do kit “QIAquick Gel Extraction” (Qiagen). Os fragmentos de interesse observados no gel de agarose foram recortados com uma lâmina de bisturi previamente limpa e colocados em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, onde foram adicionados 3 volumes de tampão QG para cada volume de gel (100 mg ~100 µL). Os tubos foram incubados a 50° C em bloco de aquecimento até que o gel dissolvesse completamente (cerca de 10 min). Após dissolução, foi adicionado 1 volume de isopropanol e a solução foi transferida para uma coluna de purificação acoplada a um tubo coletor e centrifugada por 1 min à máxima velocidade. O filtrado foi descartado e para lavagem foram adicionados 750 µL de tampão PE na coluna, sendo que os tubos foram centrifugados por 1 min à máxima velocidade. O filtrado foi descartado e após nova centrifugação, a coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e foram adicionados 30 µL de tampão EB (Tris-Cl, pH 8,5) para a eluição.

Os resultados das purificações foram analisados submetendo-se uma alíquota de 5 µL do produto purificado a eletroforese em gel de agarose 0,8% (RAPLEY, 1999), visualizado sob luz ultravioleta.

3.5.2. Reação de ligação com o vetor

Os fragmentos de interesse obtidos na PCR foram purificados e ligados ao vetor pTZ57R/T, ilustrado na Figura 1, do kit “InsTAclone™ PCR Cloning Kit” (Fermentas) seguindo-se o protocolo do fabricante.

Para aumento da eficiência de ligação inserto-vetor, foi realizada uma reação de ciclagem para incorporação de adenosina trifosfato nas extremidades 3' dos

fragmentos gerados na PCR. Para tanto, a reação foi realizada com 25 µL do fragmento purificado, 0,5 µL de dATP (10mM), 2,5 µL de tampão de *Taq* (10X, contendo 100 mM Tris-HCl pH 8,8, 200 mM (NH₄)₂SO₄ e 0,1% (v/v) Tween[®] 20), 2,0 µL de MgCl₂ (50 mM) e 0,5 µL de *Taq* DNA Polimerase (5 U/µL, Fermentas) e H₂O Milli-Q autoclavada para um volume final de 50 µL. A reação foi incubada a 72° C por 30 min, purificada com o auxílio do kit “QIAquick PCR Purification kit” (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante e utilizada para a reação de ligação.

Para cada reação de ligação, em um tubo de 1,5 mL, foram adicionados 3 µL do vetor pTZ57R/T (55 ng/µL), 6 µL do tampão de ligação (5X), 1 µL da enzima T4 DNA ligase (5 U/µL), 150 ng do fragmento da PCR a ser ligado e H₂O Milli-Q autoclavada para um volume final de 30 µL. As reações foram incubadas por a 16 h a 16° C e depois submetidas à transformação em *E. coli* linhagem DH10B competente.

3.5.3. Preparo de células competentes

Uma colônia da bactéria *Escherichia coli* da linhagem DH10B foi inoculada em 5 mL de meio TYM (anexo) e incubada a 37° C sob agitação de 250 rpm por um período de 12 a 16 h. A seguir a cultura foi diluída em 10 mL de TYM e incubada até atingir absorbância (600 nm) entre 0,2 e 0,6. Os 10 mL da cultura foram diluídos em 40 mL de TYM e incubados até atingir absorbância entre 0,5 e 0,9. Em seguida os 50 mL da cultura foram diluídos em 200 mL de meio TYM e incubado a 37° C até atingir a absorbância de 0,6. A cultura foi resfriada rapidamente e mantida em banho de gelo até o final do procedimento. As células foram centrifugadas por 15 min a 4000 rpm, a temperatura de 4° C, em tubos falcons previamente resfriados. As células foram ressuspensas em 100 mL da solução TBF1 (anexo) gelada e centrifugadas por 8 min a 4000 rpm, a 4° C. As células foram ressuspensas em 10 mL da solução TBF2 (anexo) gelada. Foram aliquotados 100 µL das células em microtubos que foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido

3.5.4. Transformação bacteriana

O processo de transformação foi realizado utilizando-se as células competentes e o produto de cada reação de ligação do inserto com o vetor. Para a

transformação, foram adicionados em um microtubo 20 µL da reação de ligação, 80 µL de tampão de transformação (anexo) e 100 µL da bactéria competente. O tubo foi incubado no gelo por 30 min e, em seguida, incubado a temperatura ambiente por 10 min. Foi adicionado, em cada microtubo, 1 mL de meio LB (Lúria-Berthani) seguindo incubação a 37° C por 50 min. Os microtubos foram centrifugados por 1 min na máxima velocidade. O pellet gerado foi ressuspendido em 100 µL do sobrenadante que foi plaqueado em meio LB contendo ampicilina (100 µg/µL), X-Gal (32 µg/µL) e IPTG (160 mM) e as placas foram incubadas por 12 a 16 horas a 37° C.

3.6. Análise dos clones recombinantes

Para verificar a eficácia do processo de clonagem, isto é, a presença de células contendo os vetores ligados ao inserto de DNA, foram realizadas as técnicas de PCR de colônias e o diagnóstico de restrição nos clones recombinantes obtidos na transformação.

3.6.1. PCR de colônias

Algumas colônias foram retiradas do meio de cultura, com auxílio de um palito esterilizado, e diluídas em 10 µL de água purificada. A presença do inserto foi verificada por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores M13 “forward” e “reverse” presentes nas extremidades do sítio de clonagem múltipla (MCS) do vetor pTZ57R/T.

As reações de PCR foram preparadas em uma solução geral contendo os 0,12 µL de iniciadores M13F e M13R (50 µM), 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 1,2 µL de MgCl₂ (50 mM), 2,5 µL de tampão para *Taq*; 0,5 µL da enzima *Taq* DNA Polimerase (5U/µL, Fermentas), 5 µL da colônia diluída e H₂O Milli-Q autoclavada para um volume final de 20 µL. A amplificação foi realizada em termociclador utilizando a seguinte condição: “hot start” de 94° C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94° C por 30 s, 43° C por 45 s, 72° C por 60 s, com uma extensão final a 72° C por 10 min.

Da mesma forma que as demais reações de PCR, os resultados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

3.6.2. Extração de DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi realizada com o kit “QIAprep Miniprep” (Qiagen). Para tanto, as células bacterianas de 2 mL de cultura, incubadas “overnight”, foram decantadas em uma centrífuga de mesa (Eppendorf – 5415D) a $16.100 \times g$ por 1 min. O pellet foi ressuspensionado em 250 μ L de tampão P1 contendo RNase, depois foram adicionados 250 μ L de tampão P2. O microtubo foi gentilmente invertido por 4 a 6 vezes e foram adicionados 350 μ L de tampão N3. Repetiu-se a homogeneização por inversão e o microtubo foi centrifugado a $16.100 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi transferido para a coluna QIAprep acoplada sobre um tubo coletor e centrifugado por 1 min a $16.100 \times g$. O filtrado foi descartado, a coluna foi lavada com 750 μ L de tampão PE e submetida a nova centrifugação, repetindo-se a mesma por 1 min para remoção de resíduos do tampão de lavagem. A coluna foi transferida para um tubo de centrifuga, foram adicionados 50 μ L do tampão de eluição EB, a coluna foi incubada à temperatura ambiente por 1 min e depois, centrifugada por 1 min a $16.100 \times g$ para eluição do DNA plasmidial.

3.6.3. Digestão de DNA plasmidial

Para verificar a presença do inserto no plasmídeo extraído, foi realizada uma digestão dupla com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* (New England Biolabs). Em um tubo de 1,5 mL foram adicionados 1 μ L de soroalbumina bovina (10X; BSA, New England Biolabs), 1 μ L de tampão 4 (10X: 50 mM de acetato de potássio; 20 mM Tris-acetato, 10 mM de acetato de magnésio, 1 mM DTT, pH 7,9; New England Biolabs), 0,3 μ L de cada enzima (20 U/ μ L), DNA plasmidial (~1 μ g) e H₂O Milli-Q autoclavada para um volume final de 10 μ L. As reações foram incubadas a 37° C por 2 h e o resultado da digestão foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

3.7. Sequenciamento

Para as reações de PCR para sequenciamento foi utilizado o kit “Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems). Foram misturados 1 μ L

de mix Big Dye, 3,5 µL do tampão de sequenciamento (5X), 1 µL de iniciadores (3,2 µM) M13 “forward” ou “reverse”, 4 µL do DNA plasmidial (100 ng/µL) e H₂O Milli-Q autoclavada para um volume final de 20 µL. As condições de amplificação foram: “hot start” de 96° C por 1 min, seguida de 25 ciclos de 96° C por 10 s, 43° C por 5 s, 60° C por 4 min e extensão final de 60° C por 5 min.

Após a amplificação, as amostras foram precipitadas com o kit “Big Dye® XTerminator™ Purification Kit” (Applied Biosystems) seguindo o protocolo do fabricante, mantendo-as na ausência de luminosidade. Para cada amostra a ser sequenciada, foram utilizados 10 µL de solução X-Terminator, 45 µL de solução SAM e 10 µL da PCR. As amostras foram submetidas a homogeneização em vórtex por 30 min e centrifugadas por 2 min a 200 x *g*, 4° C. O sequenciamento automático foi realizado com 20 µL de cada amostra no sequenciador Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems).

3.8. Análise *in silico*: programas computacionais utilizados

A qualidade e confiabilidade dos sequenciamentos realizados foram verificadas com o software “Sequence Scanner v1.0” (Applied Biosystems) e o editor “BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.9.0” (HALL, 1999), adotando como valores de qualidade acima de phred 20. A ferramenta Blastn – “Basic Local Alignment Search Tool” foi utilizada para comparações de identidade dos fragmentos clonados com as sequências gênicas já depositadas nos bancos de dados públicos (ALTSCHUL et al., 1990).

O alinhamento das sequências obtidas foi realizado com a ferramenta ClustalW2, que permite o alinhamento de sequências de nucleotídeos a partir de suas sequências FASTA e, assim, possibilita a visualização das regiões conservadas entre os genes alinhados, bem como a identificação de regiões para o desenho de iniciadores (THOMPSON et al., 1994).

3.9. Amplificação Rápida das Extremidades 3’ do cDNA (RACE 3’)

A amplificação das extremidades 3’ do fragmento “core” de OSCs foi realizada com auxílio do kit 3’ RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Iniciadores específicos desenhados

na extremidade 3' a partir do sequenciamento e alinhamento dos fragmentos "core" e foram utilizados na amplificação das regiões 3' do cDNA sintetizado.

3.9.1 Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado com o kit RACE 3' seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante, como descrito anteriormente, utilizando o iniciador AP (Tabela 2A). Em seguida, o cDNA obtido foi empregado para amplificação das extremidades 3' com iniciadores "forward" gene específicos.

3.9.2 Amplificação rápida das extremidades 3' do cDNA (RACE 3')

Para amplificação das extremidades 3' do cDNA molde, foram utilizados iniciadores gene específico "forward" desenhados com base nas extremidades 3' de cada grupo obtido nas análises dos fragmentos "core" (Tabela 2A) e um iniciador AUAP "reverse" (Tabela 2C) fornecido no kit. Foi, também, realizada uma reação de nested PCR com iniciadores gene específico para cada grupo e o iniciador AUAP, para gerar produtos da amplificação mais específicos. .

Para a amplificação, foram adicionados e misturados em um tubo de 200 µL os seguintes reagentes: 5 µL de tampão 10X (20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl); 3 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de iniciador gene específico forward (10 mM); 1 µL do iniciador "reverse" AUAP (10 mM), 1 µL de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL, Fermentas), 2 µL do cDNA sintetizado e H₂O Milli-Q autoclavada para um volume final de 50 µL. O tubo foi centrifugado brevemente e a amplificação, realizada em termociclador utilizando a seguinte condição: 94° C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 94° C por 45 s, 62° C por 60 s, 72° C por 90 s e uma extensão final a 72° C por 10 min. Com os produtos gerados na amplificação, foram então realizadas as reações de "nested" com outros iniciadores gene específicos para cada grupo (Tabela 3B). As condições utilizadas para a reação e ciclagem foram iguais às descritas acima. O produto de cada PCR foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

Os fragmentos de tamanho específico resultantes das reações de nested PCR, obtidos para cada um dos grupos, foram clonados no vetor pTZ57R/T, sequenciados e analisados pelos mesmos procedimentos descritos anteriormente.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para clonagem dos fragmentos da extremidade 3' do cDNA de OSCs e suas principais características.

A - Iniciadores gene específicos para PCR				
Grupo	Iniciador (Sense)	Tamanho (nt)	Tm Média (°C)	Sequência 5' – 3'
CS4	VZO 1134	20	70,6	GGAGGGCTAGCAGCAGCTGG
TS5	VZO 1133	24	68,6	GTGCAGTTATCTGATGGCTCATGG
TS6	VZO 1132	20	69,7	AGGGGCTTGTAGCAGCTGGG
TS12	VZO 1164	20	64,8	CTGGACTTAATGCTGCTGGC
CS19	VZO 1165	18	64,6	AAGGGCTCACAGCAGCTG

B - Iniciadores gene específicos para “nested” PCR				
Grupo	Iniciador (Sense)	Tamanho (nt)	Tm Média (°C)	Sequência 5' – 3'
CS4	VZO 1137	19	69,4	TGTCAGGCTGTGCGCAGAG
TS5	VZO 1136	19	69,1	ACTCGGAGGGCTAGCAGCG
TS6	VZO 1135	20	69,6	AGCCTTCGTAAGGCTTGCGC
TS12	VZO 1168	24	66,4	GTTTGGCTATACGCAAAGGAGTTG
CS19	VZO 1169	21	65,9	CATGCTGTGCGTAGAGGTGTC

C – Iniciadores universais “reverse” para síntese de cDNA, PCR e “nested” PCR				
Iniciador	Reação	Tamanho (nt)	Tm Média (°C)	Sequência 5' – 3'
AP	Síntese de cDNA	37	75,3	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTT TTTTTTTTTTTT
AUAP	PCR e nested PCR	20	67,2	GGCCACGCGTCGACTAGTAC

3.10. Extensão dos fragmentos “core” no sentido 5’

O cDNA sintetizado foi empregado como molde, também, nas reações de amplificação para extensão no sentido 5’ dos fragmentos “core” dos genes codificadores de OSCs. Para tanto, foram utilizados iniciadores gene específico “reverse” (Tabela 3), desenhados com base nas extremidades 5’ de cada grupo obtido nas análises dos fragmentos “core”. Foi empregado um iniciador “forward” degenerado descrito por Guhling et al. (2006).

As reações de PCR foram realizadas seguindo-se o mesmo protocolo descrito para amplificação dos fragmentos “core”, sendo que a única alteração foi o ajuste da temperatura de anelamento dos iniciadores para 60° C.

O produto de cada PCR foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Os fragmentos resultantes de cada grupo foram clonados no vetor pTZ57R/T, sequenciados e analisados pelos mesmos procedimentos descritos anteriormente.

Tabela 3. Iniciadores utilizados para clonagem dos fragmentos de extensão no sentido 5’ do “core” de OSCs e suas principais características.

Grupo	Iniciador (“reverse”)	Tamanho (nt)	Tm Média (°C)	Sequência 5’ – 3’
CS4	VZO1192(R)	25	58,7	GAGTAGGAGCTACTTCATCTGTGAG
TS5	VZO1193(R)	22	63,5	ATGCCTTGACAAGAGTAGGAGC
TS6	VZO1194(R)	22	57,7	GACACAGACCATACTCTTCAAC
TS12	VZO1195(R)	22	64,6	TGGACTGATTTTACTGGCGAGG
CS19	VZO1196(R)	23	63,0	GCCTTGACAAGAGTAGGTGCTAC
OSCs*	VZO1040 (F)	22	66,7	CARWAYRDDGAYGGNGGNTGGG

* Iniciador degenerado descrito por Guhling et al. (2006).

3.11. Amplificação Rápida das Extremidades 5' do cDNA (RACE 5')

A amplificação das extremidades 5' do fragmento “core” de OSCs foi realizada com auxílio do kit 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Iniciadores específicos desenhados a partir da extremidade 5' dos fragmentos da extensão sequenciados e alinhados, foram utilizados na amplificação das regiões 5' do cDNA sintetizado. Iniciadores universais ou adaptadores também foram utilizados para a síntese de cDNA e podem ser conferidos na Tabela 4 junto com os iniciadores específicos para a amplificação da extremidade 5'.

Tabela 4. Iniciadores utilizados para clonagem dos fragmentos da extremidade 5' do cDNA de OSCs e suas principais características.

A - Iniciador específico para síntese do cDNA				
Grupo	Iniciador ("reverse")	Tamanho (nt)	Tm (°C)	Sequência 5' – 3'
CS4	VZO1172	22	69,3	GCATCTTCGTCTGGTCCCCTC
TS6	VZO1174	21	63,5	GTCCAAGATCCATTTCCTTCC
TS12	VZO1175	20	64,3	GTATTCGCCACCATCAGGTC
CS19	VZO1404	20	65,8	GTGATACCGCCACGATCAAG
B - Iniciadores gene específicos para PCR				
Grupo	Iniciador ("reverse")	Tamanho (nt)	Tm (°C)	Sequência 5' – 3'
CS4	VZO1176	24	68,3	GCAAACATAAGTGAATGCTGTGGC
TS6	VZO1178	18	63,5	CACCCTCTCCACCCTCAG
TS12	VZO1179	23	62,2	GCAAACGCATACAAACATAGTTC
CS19	VZO1405	20	65,8	AAGCATCTTCGTCTGGTCCC

C- Iniciadores gene específicos para nested PCR

Grupo	Iniciador ("reverse")	Tamanho (nt)	T _m (°C)	Sequência 5' – 3'
CS4	VZO1180	21	68,1	GCAAACACTGTGCTGTGTCCC
TS6	VZO1182	24	62,3	AGCAACCTCAAAGTGACATAGTTC
TS12	VZO1183	24	63,5	CATCATGCTAGGACCTTCTATGTG
CS19	VZO1406	22	65,1	CACTGTGCTGTGTCCCTCTATG

D - Iniciadores universais "forward" para síntese de cDNA, PCR e nested PCR

Iniciador	Reação	Tamanho (nt)	T _m (°C)	Sequência 5' – 3'
AP	Síntese de cDNA PCR e	37	75,3	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTT TTTTTTTTTTTT
AUAP	"nested" PCR	20	67,2	GGCCACGCGTCGACTAGTAC

3.11.1. Síntese do cDNA

Para a síntese do cDNA, em um tubo de 0,5 mL, foram adicionados 5 µg de RNA total; 2,5 pmoles de iniciador gene específico mais um volume de água, livre de nucleases, suficiente para ajustar o volume final em 15,5 µL. A mistura foi incubada a 70° C por 10 minutos, para desnaturar o RNA, resfriada no gelo por 1 minuto e o tubo centrifugado brevemente. Foram adicionados 2,5 µL de tampão 10X de PCR (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4 e KCl 500 mM), 2,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de dNTPs (10 mM) e 2,5 µL DTT (0,1 M); o tubo foi centrifugado brevemente e incubado a 42° C por 1 minuto. Em seguida, foi adicionado 1 µL da enzima SuperScript™ II RT

(200 U/ μ L), o tubo foi centrifugado brevemente e a reação foi incubada a 42° C por 30 minutos. Para finalizar a reação, o tubo foi incubado a 70° C por 15 minutos, centrifugado brevemente e incubado a 37° C por 1 minuto. Foi adicionado 1 μ L de RNase H e a reação foi incubada a 37° C por 30 minutos. O tubo foi novamente centrifugado e armazenado no gelo.

3.11.2 Purificação do cDNA

Foram adicionados 120 μ L de solução de ligação (Nal 6M) ao cDNA sintetizado. A mistura (cDNA/Nal) foi transferida para uma coluna S.N.A.P e centrifugada por 20 segundos a 13.000 x *g*. O filtrado foi descartado e a coluna lavada quatro vezes com 400 μ L do tampão de lavagem 1X gelado, centrifugando-se a coluna por 20 segundos a 13.000 x *g*. A coluna foi lavada mais duas vezes com etanol 70% e uma vez vazia para remoção de resíduos de etanol, utilizando as mesmas condições das centrifugações anteriores. Em seguida, a coluna foi transferida para um microtubo novo e o cDNA foi eluído com 50 μ L de água pré-aquecida a 65° C.

3.11.3 Adição de cauda poli-C ao cDNA

Para adição de cauda poli-C na extremidade 5' do cDNA, foram adicionados em um microtubo: 6,5 μ L de água livre de nucleases, 5 μ L do tampão 5X (Tris-HCl 50 mM, pH 8,4, KCl 125 mM, MgCl₂ 7,5 mM), 2,5 μ L de dCTP (2 mM) e 10 μ L do cDNA purificado. A reação foi incubada a 94° C por 3 minutos e resfriada no gelo por 1 minuto. Foi adicionado 1 μ L da enzima TdT e a reação incubada a 37° C por 10 minutos. Em seguida, para inativar a enzima, a reação foi aquecida a 65° C por 10 minutos, o tubo foi centrifugado e armazenado no gelo.

3.11.4 Amplificação das extremidades 5' do cDNA

O cDNA com cauda dC foi utilizado para amplificação da extremidade 5' dos genes de OSCs. Para a amplificação, foram adicionados e misturados em um tubo de 200 μ L os seguintes reagentes: 5 μ L de tampão 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl); 3 μ L de MgCl₂ (25 mM), 1 μ L de dNTPS (10 mM); 2 μ L de iniciador

“forward” gene específico (10 μ M); 2 μ L do iniciador “reverse” AAP (10 μ M); 0,5 μ L de *Taq* DNA polimerase (5 U/ μ L), 5 μ L do cDNA sintetizado e H₂O Milli-Q autoclavada para um volume final de 50 μ L. O tubo foi centrifugado brevemente e a amplificação, realizada em termociclador utilizando a seguinte condição: 94° C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94° C por 30 s, 60° C por 45 s, 72° C por 60 s e uma extensão final a 72° C por 10 min. Os produtos gerados na amplificação foram utilizados nas reações de “nested” PCR.

3.11.5 “Nested” PCR

Um volume de 5 μ L do produto obtido na PCR foi diluído em 495 μ L de tampão TE (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA). Para a amplificação, foram adicionados em um tubo de 200 μ L os seguintes reagentes: 5 μ L de tampão 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl); 3 μ L de MgCl₂ (25 mM), 1 μ L de dNTPS (10 mM); 2 μ L de iniciador “forward” gene específico (10 μ M); 2 μ L do iniciador “reverse” AUAP (10 μ M); 0,5 μ L de *Taq* DNA polimerase (5 U/ μ L), 5 μ L do produto de PCR diluído e H₂O Milli-Q autoclavada para um volume final de 50 μ L. O tubo foi centrifugado brevemente e a amplificação, realizada em termociclador utilizando a seguinte condição: 94° C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94° C por 30 s, 60° C por 45 s, 72° C por 60 s e uma extensão final a 72° C por 10 min.

O produto de cada PCR foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Os fragmentos de tamanho específico resultantes das reações de “nested” PCR, obtidos para cada um dos grupos, foram clonados no vetor pTZ57R/T, sequenciados e analisados pelos mesmos procedimentos descritos anteriormente.

3.12. Clonagem das ORFs de OSCs de *M. ilicifolia*

Para obtenção das ORFs de *M. ilicifolia* foram desenhados iniciadores de acordo com as sequências das extremidades 5' e 3' obtidas. As ORFs foram clonadas no vetor pTZ57R/T e sequenciadas com iniciadores internos para depois serem subclonadas no vetor de expressão pYES2.

3.12.1. Desenho de iniciadores específicos para amplificação das ORFs de OSCs

Através da análise das sequências obtidas das extremidades 5' e 3' foram desenhados iniciadores específicos (Tabela 5) para amplificação das ORFs das prováveis oxidoesqualeno ciclases, utilizando como molde o cDNA de *M. ilicifolia*.

Tabela 5. Iniciadores específicos “forward” e “reverse” utilizados para amplificação das ORFs de oxidoesqualeno ciclases de *M. ilicifolia* e suas principais características.

Grupo	Iniciador	Tamanho (nt)	Tm (C°)	Sequência 5' – 3'	Sítio de restrição
CS4 F	VZO1380	32	78,3	CGC GGATCC ATCATGTGGAAGATAAAGATTGC	<i>BamHI</i>
CS4 R	VZO1382	35	72,0	G GAAATTC CGTGTAAGTGGACATATCATATGATAGC	<i>EcoRI</i>
TS6F	VZO1371	32	84,9	CGC GGATCC GCGACAATGTGGAGGCTCAAATT	<i>BamHI</i>
TS6R	VZO1372	36	73,9	TGCT CTAGAG CAAATTCAAAGAGACTGTAATACCCG	<i>XbaI</i>
TS12F	VZO1362	35	82,6	CGC GGATCC CGATCATGTGGAAGATAAAGATTGC	<i>BamHI</i>
TS12R	VZO1363	31	70,6	G GAAATTC CTTACAAGTCTTGAGCACTTTCAG	<i>EcoRI</i>

Na sequência dos iniciadores acima, a região em negrito corresponde ao sítio de restrição das enzimas utilizadas para subclonagem das ORFs no vetor de expressão.

3.12.2. Amplificação das ORFs de oxidoesqualeno ciclases e clonagem no vetor pTZ57R/T

Para amplificação das ORFs foram adicionados e misturados em um tubo de 200 µL os seguintes reagentes: 2,5 µL de tampão de amplificação (10X); 1,25 µL de solução enhancer (10X); 0,5 µL de MgSO₄ (50 µM); 0,5 µL de dNTPs (10 mM); 0,5 µL de cada iniciador específico (50 µM); 0,2 µL da enzima *Pfx* DNA polimerase (2,5 U/µL - Invitrogen), 0,5 µL de cDNA e H₂O Milli-Q autoclavada para completar o volume para 25 µL. O tubo foi centrifugado brevemente e a amplificação, realizada em termociclador utilizando a seguinte condição: 94° C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94° C por 30 s, 55° C por 45 s, 68° C por 3 min e uma extensão final a 68° C por 10 min.

O produto de cada PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Os fragmentos de tamanho específico (~2400 pb) resultantes das reações PCR, obtidos para cada um dos grupos, foram purificados e clonados no vetor pTZ57R/T pelos mesmos procedimentos descritos anteriormente. A clonagem foi confirmada por PCR de colônias (alterando apenas o tempo de extensão para 180 segundos em relação às condições de PCR de colônia descrita anteriormente) e por diagnóstico de restrição conforme já descrito.

3.12.3. Sequenciamento das ORFs de oxidoesqualeno ciclases

Para o sequenciamento completo das ORFs das oxidoesqualeno ciclases, foram desenhados iniciadores específicos para amplificação das regiões correspondentes aos fragmentos “core”, extensão e extremidades 5' e 3' de cada grupo como mostra a Tabela 6, sendo que para o sequenciamento das extremidades 5' e 3' foram utilizados os iniciadores universais M13F e M13R presentes nas extremidades do cassete de clonagem do vetor pTZ57R/T.

Tabela 6. Iniciadores “forward” e “reverse” para sequenciamento das ORFs completas de oxidoesqualeno ciclases de *M. ilicifolia*.

Grupo	Região/ Sentido	Iniciador	Tamanho (nt)	Tm (°C) Média	Sequência 5' – 3'
CS4	5' / R	VZO1508	18	55,1	CGCTCCAAGTATTCTCAT
	Extensão	VZO1473	18	55,8	GGGACACAGCACAGTGTTT
	5' / F				
	Extensão	VZO1506	19	55,9	GGGTTATCTCTGACCTGAC
	5' / R				
	Core / F	VZO1471	25	61,8	CTCACAGATGAAGTAGCTCCTA CTC
	Core / R	VZO1472	20	63,4	CCGAGTGCAAACATTGTACC
TS6	3' / F	VZO1507	17	56,0	TGATGGCTCATGGTATG
	5' / R	VZO1512	19	60,1	CAAGATCCATTTCCTTCCA
	Extensão	VZO1510	21	58,3	ACTATGTCACTTTGAGGTTGC
	5' / F				
	Extensão	VZO1194	20	54,3	GACACAGACCATACTCTTCAAC
	5' / R				
	Core / F	VZO1511	19	59,2	CATTCAGACTGCACATTCC
	Core / R	VZO1036	18	59,8	TRRCTYTCHCYCCAHCACC
	3' / F	VZO1513	20	59,8	AATAAAGGGGCTTGTAGCAG

As reações de PCR para o sequenciamento foram realizadas utilizando o kit “Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems). Foram misturados 1 µL de mix Big Dye, 3,5 µL do tampão de sequenciamento (5X), 1 µL de iniciadores (3,2 µM) M13 “forward”, “reverse” e iniciadores específicos, 4 µL do DNA plasmidial (100 ng/µL) e H₂O Milli-Q autoclavada para um volume final de 20 µL. As condições de amplificação foram: “hot start” de 96° C por 1 min, seguida de 25 ciclos de 96° C por 10 s, 43-55° C por 5 s, 60° C por 4 min e extensão final de 60° C por 5 min. A temperatura de anelamento foi ajustada de 43 a 55° C de acordo com cada iniciador.

Após a amplificação, as amostras foram precipitadas com o kit “Big Dye® XTerminator™ Purification Kit” (Applied Biosystems) seguindo o protocolo do fabricante, mantendo-as na ausência de luminosidade. Para cada amostra a ser

sequenciada, foram utilizados 10 µL de solução X-Terminator, 45 µL de solução SAM e 10 µL da PCR. As amostras foram submetidas a homogeneização em vórtex por 30 min e centrifugadas por 2 min a 200 x g, 4° C. O sequenciamento automático foi realizado com 20 µL de cada amostra no sequenciador Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems).

3.13. Construção de Dendograma com as sequências de OSCs obtidas

O alinhamento de sequências foi realizada com o programa ClustalW2, usando sequências de aminoácidos já clonadas e caracterizadas de oxidoesqualeno ciclasas de plantas. Para comparação e clusterização das sequências de OSCs clonadas neste trabalho com outras OSCs já descritas, foi criado um dendograma com o programa MEGA 5 (versão 5.2) utilizando o método “neighbor-joining” e o número de replicações bootstraps 1000. O número de acesso no GenBank das sequências utilizadas na análise são descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Sequências utilizadas na construção do dendograma.

Número de acesso	Espécie	Função
At4g15340	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabidiol sintase PEN1
At5g48010	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thalianol sintase PEN4
At5g42600	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Marneral sintase PEN5
At1g78500	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Multifuncional triterpeno sintase PEN6
At3g45130	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Lanosterol sintase LAS1/PEN7
At1g78970	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Multifuncional triterpeno sintase ILUP1
At1g78960	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Multifuncional triterpeno sintase LUP2
At1g66960	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Multifuncional triterpeno sintase LUP5
At2g07050	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cicloartenol sintase CAS1
AB263204	<i>Rhizophora stylosa</i>	Multifuncional triterpeno sintase RsM2
AB289586	<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	Lupeol sintase BgLUS
AB257507	<i>Kandelia candel</i>	Multifuncional triterpeno sintase KcMS
DQ268869	<i>Ricinus communis</i>	Lupeol sintase RcLUS
AB058643	<i>Luffa cylindrica</i>	Isomultiflorenol sintase LcIMS1
AB037203	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	β-amirina sintase GgbAS1
AB181244	<i>Lotus japonicus</i>	β-amirina sintase OSC1
AB034802	<i>Pisum sativum</i>	β-amirina sintase PSY

AF478453	<i>Medicago truncatula</i>	β -amirina sintase AMY1
AF478455	<i>Lotus japonicus</i>	Multifuncional triterpeno sintase LjAMY2
AB034803	<i>Pisum sativum</i>	Multifuncional triterpeno sintase PSM
AB009030	<i>Panax ginseng</i>	β -amirina sintase PNY
AB014057	<i>Panax ginseng</i>	β -amirina sintase PNY2
AB055512	<i>Betula platyphylla</i>	β -amirina sintase BPY
ADK35123	<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Taraxerol sintase KdTAS
AB263203	<i>Rhizophora stylosa</i>	Multifuncional triterpeno sintase RsM1
AB206469	<i>Medicago tirucalli</i>	β -amirina sintase EtbAS
ADK35125	<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Friedelina sintase KdFRS
ADK35124	<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Glutinol sintase KdGLS
ADK35126	<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Lupeol sintase KdLUS
AB025343	<i>Olea europaea</i>	Lupeol sintase OEW
AB025345	<i>Taraxacum officinale</i>	Lupeol sintase TRW
AB181245	<i>Lotus japonicus</i>	Lupeol sintase OSC3
AB116228	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Lupeol sintase GgLUS1
AB055511	<i>Betula platyphylla</i>	Lupeol sintase BPW
AB181246	<i>Lotus japonicus</i>	Cicloartenol sintase OSC5
AB025968	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Cicloartenol sintase GgCAS1
D89619	<i>Pisum sativum</i>	Cicloartenol sintase PSX
AB009029	<i>Panax ginseng</i>	Cicloartenol sintase PNx
ADK35127	<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Cicloartenol sintase KdCAS
AB033335	<i>Luffa cylindrica</i>	Cicloartenol sintase LcCAS1
AB055509	<i>Betula platyphylla</i>	Cicloartenol sintase BPX1
AB009031	<i>Panax ginseng</i>	Lanosterol sintase PNZ
AB244671	<i>Lotus japonicus</i>	Lanosterol sintase OSC7
XP_002310351.1	<i>Vitis vinifera</i>	β -amirina sintase VvbAS
XP_004139371.1	<i>Cucumis sativus</i>	Isomultiflorenol sintase CsIMS
XP_004141754.1	<i>Cucumis sativus</i>	Cicloartenol sintase CsCAS
XP_004303790.1	<i>Fragaria vesca</i>	Cicloartenol sintase FvCAS
XP_004305792.1	<i>Fragaria vesca</i>	β -amirin sintase FvbAS
XP_002269849.1	<i>Vitis vinifera</i>	Cicloartenol sintase VvCAS

3.14. Subclonagem das ORFs no vetor pYES2

As ORFs de oxidoesqualeno ciclases obtidas foram subclonadas no vetor de expressão pYES2 (Invitrogen), sob controle do promotor de *GAL1*. Para tanto, o vetor pYES e o vetor pTZ57R/T contendo o inserto foram digeridos com as enzimas de restrição apropriadas presentes no cassete de clonagem do vetor e nas extremidades do inserto.

3.14.1. Digestão do vetor pYES2 e do inserto

Para a digestão do vetor de expressão pYES e do inserto presente no vetor de clonagem pTZ57R/T foram adicionados em um microtubo os seguintes reagentes: 2 µL de soroalbumina bovina (10X; BSA, New England Biolabs), 2 µL de tampão 4 (10X: 50 mM de acetato de potássio; 20 mM Tris-acetato, 10 mM de acetato de magnésio, 1 mM DTT, pH 7,9; New England Biolabs), 0,6 µL de cada enzima (20 U/µL), 1 µL de DNA plasmidial (~500 µg) e H₂O Milli-Q autoclavada para um volume final de 20 µL. Para a subclonagem dos insertos pertencentes aos grupos CS4 e TS6, foram utilizadas nas reações de digestão as enzimas *BamHI* + *EcoRI* e *BamHI* + *XbaI*, respectivamente. As reações foram incubadas a 37° C por 2 h e o resultado da digestão foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,2 % corado com brometo de etídio. As bandas referentes ao vetor pYES2 (~6 Kb) e ao inserto (~2,4 Kb) foram recortadas e purificadas do gel seguindo o protocolo descrito anteriormente. e depois foram utilizadas na reação de ligação.

3.14.2. Reação de Ligação

Para a reação de ligação foram adicionados em um microtubo, 2 µL de tampão da ligase (10X, 50 mM de Tris-HCl, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de ATP, 10 mM de DTT, pH 7,5), 1 µL de T4 DNA ligase (400 U/µL; New England Biolabs), 50 ng do vetor pYES2 purificado, 50 ng de inserto purificado e água Milli-Q autoclavada suficiente para completar 20 µL de reação. A reação foi incubada a 16 °C por 48 horas.

3.14.3. Transformação bacteriana

A reação de ligação foi transformada em *E. coli* linhagem DH10B competente seguindo o protocolo descrito anteriormente.

3.14.4. Análise dos clones recombinantes

Para verificar a eficácia do processo de clonagem, foi realizada a técnica de PCR de colônias. Para tanto, algumas colônias foram retiradas do meio de cultura, com auxílio de um palito esterilizado e diluídas em 10 µL de água pura. A presença do inserto foi verificada por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores específicos “forward” e “reverse” presentes nas extremidades dos insertos.

As reações de PCR foram preparadas em uma solução geral contendo 0,12 µL de iniciadores “forward” e “reverse” (50 µM), 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 1,2 µL de MgCl₂ (50 mM), 2,5 µL de tampão para *Taq*; 0,5 µL da enzima *Taq* DNA Polimerase (5U/µL, Fermentas), 5 µL da colônia diluída e H₂O Milli-Q autoclavada para um volume final de 20 µL. A amplificação foi realizada em termociclador utilizando a seguinte condição: “hot start” de 94° C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94° C por 30 s, 55° C por 45 s, 72° C por 180 s, com uma extensão final a 72° C por 10 min.

Da mesma forma que as demais reações de PCR, os resultados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Com as colônias que mostraram a presença do inserto foi realizada a extração plasmidial para posterior transformação em levedura.

O DNA plasmidial extraído foi utilizado, também, para sequenciamento com o iniciador T7 (5' – TAATACGACTCACTAT – 3'), o qual está presente na região 5' do cassete de clonagem do vetor pYES2, para confirmação da direcionalidade correta do inserto.

3.15. Transformação de levedura

Uma colônia de levedura, linhagem CEN.PK selvagem, foi inoculada em 5 mL de meio YPD e incubada a 30° C, por 12 a 16 horas. Uma alíquota de 1 mL da cultura foi centrifugada em um microtubo por 5 segundos na máxima velocidade. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 1 mL de acetato de lítio (LiAc) 100 mM e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. O tubo foi centrifugado por 5 segundos na máxima velocidade e o sobrenadante removido por pipetagem. Foram adicionados na seguinte ordem os reagentes: 240 µL de polietilenoglicol (PEG - 50%), 36 µL de LiAc (1 M), 50 µL de SS-DNA (2 mg/mL), 10 µL de DNA plasmidial e 45 µL de água Milli-Q autoclavada, o tubo foi vortexado por

1 minuto e incubado a 42° C por 20 minutos. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 10 segundos, na máxima velocidade e o sobrenadante removido com o pipetador. O “pellet” foi ressuspendido em 150 µL de água Milli-Q autoclavada, plaqueado em meio sintético completo sem a adição de uracila (SC-URA); e incubado a 30° C por 2-3 dias. Colônias isoladas das leveduras transformadas foram repassadas para outra placa SC-URA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração de RNA e Síntese de cDNA

Entre as metodologias de extração de RNA disponíveis atualmente, as que utilizam soluções a base de tampões de guanidina apresentam melhor rendimento e alta qualidade das amostras de RNA. Tampões de tiocianato de guanidina ou hidrocloreto de guanidina são extremamente caotrópicos, sendo os mais eficazes agentes desnaturantes de proteínas, incluindo as RNases (FARREL, 2010).

Tratando-se da extração de RNA de plantas, é necessário levar em conta a presença de compostos fenólicos e polissacarídeos que promovem a degradação e oxidação dos ácidos nucleicos durante o procedimento de extração a partir de diferentes tecidos, interferindo no isolamento e na qualidade do RNA (CORDEIRO, 2010).

Para estimar a pureza do RNA extraído, é fundamental observar a relação de absorbância entre ácidos nucleicos e proteínas (260/280 nm) e entre ácidos nucleicos e polissacarídeos, fenol ou sais (260/230 nm), que deve ser estar entre 1,8 a 2,0, indicando que a presença desses contaminantes está em nível insignificante.

A integridade do RNA total deve ser verificada por eletroforese desnaturante em gel de agarose, observando-se uma banda referente à subunidade 28S, de intensidade em torno de duas vezes maior que a banda correspondente à subunidade 18S e pouco arraste entre e abaixo dessas bandas devem existir, pois indicam a degradação do RNA, enquanto bandas acima da subunidade 28S indicam contaminação por DNA (FARREL, 2010).

Neste estudo, o primeiro método a ser utilizado foi a extração com o reagente Trizol (Invitrogen), uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Posteriormente, optou-se por outro método de extração utilizando o kit “SV Total RNA Isolation System” (Promega), que utiliza um tampão composto por tiocianato de guanidina e β -mercaptoetanol. Por fim, foi realizada outra extração com o kit “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen) que contém duas opções de tampões, um constituído por tiocianato de guanidina e outro por hidrocloreto de guanidina, ambos utilizados após adição de β -mercaptoetanol. Dentre estes três métodos empregados, a concentração, a qualidade e a integridade de RNA extraído foram insatisfatórias nas extrações realizadas com o reagente Trizol e com o kit “SV Total RNA Isolation

System” (dados não mostrados). A opção pelo kit “RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)” com o tampão de hidrocloreto de guanidina (tampão RLC) foi eficiente para uso do RNA extraído das folhas de *M. ilicifolia* para a síntese de cDNA.

A integridade do RNA extraído com o tampão RLC foi verificada por eletroforese desnaturante em gel de agarose (Figura 8A), em que foi possível observar a banda correspondente à subunidade 28S de rRNA apresentando maior intensidade que a banda correspondente à subunidade 18S.

A estimativa da pureza do RNA extraído foi verificada pelo valor da relação entre 260/230 nm e 260/280 nm acima de 1,8. Pelo cálculo de quantificação, as extrações com “RNeasy Plant Mini Kit” renderam em torno de 500 µg/mL de RNA total.

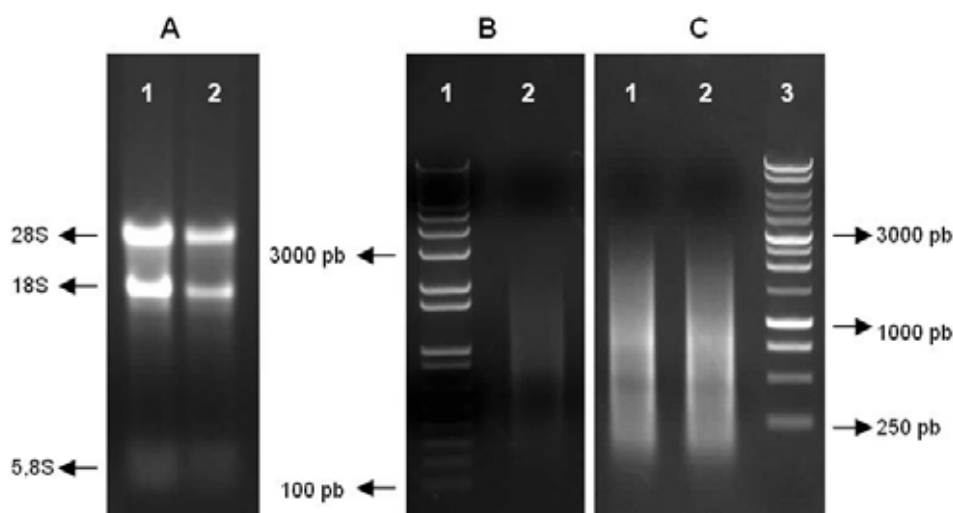


Figura 8. Confirmação de RNA total e cDNAs obtidos. A) Eletroforese desnaturante em gel de agarose (1,2%) de RNA total extraído de folhas de *M. ilicifolia*; amostras 1 (5,2 µg) e 2 (3,8 µg) correspondentes a duas extrações com tampões RLC e RLT, respectivamente. B) Síntese de cDNA, 1: Marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen) e 2: cDNA sintetizado com oligo-dT e SuperScript™II (RACE 3'). C) Síntese de cDNA, 1 e 2: cDNA sintetizado com iniciadores randômicos e MultiScribe® (High Capacity), 3: Marcador de peso molecular 1Kb (Promega).

Assim, após obtenção de RNA total de qualidade adequada, foi possível proceder à síntese de cDNA a partir de mRNA utilizando oligonucleotídeos randômicos e a transcriptase reversa MultiScribe® (MMLV) do kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription”. As fitas de cDNA resultantes foram utilizadas diretamente como molde nas reações de PCR, sem tratamento com RNase. A síntese de cDNA foi realizada, também, com iniciadores oligo-dT e a enzima SuperScript™II do kit “3' RACE “System for Rapid Amplification of cDNA Ends”

(Invitrogen) e foram tratadas com RNase H sendo depois utilizadas diretamente nas reações de PCR.

A qualidade de amplificação do cDNA total obtido pode ser observada nas Figuras 8B e 8C em que a presença de um arraste de ácido nucleico, sem formação de bandas nítidas, confirma a transcrição reversa de mRNAs de variados tamanhos.

4.2. Clonagem do fragmento “core”

Para realizar a amplificação dos fragmentos “core” dos genes de cicloartenol sintase (metabolismo primário) e triterpeno sintases (metabolismo secundário), foi necessário o uso de oligonucleotídeos iniciadores degenerados desenhados de acordo com o alinhamento de sequências de aminoácidos de oxidoesqualeno ciclases já existentes na literatura (GUHLING et al., 2006). A porção “core” representa a região central de OSCs a qual apresenta o domínio funcional das enzimas. A partir de dados da literatura, estimou-se que os fragmentos a serem obtidos com as reações de amplificação com os iniciadores “forward” e “reverse” (Figura 9) deveriam ser de aproximadamente 750 pares de bases (pb) (WANG et al., 2010).

A partir do alinhamento de OSCs, de diferentes espécies vegetais, é possível observar uma região de diferença dos resíduos de aminoácidos entre grupo de cicloartenol sintases e triterpeno sintases por volta da posição 415 (GUHLING et al., 2006), como ilustrado na Figura 10A. Assim, a região abrangendo os resíduos marcados por asteriscos na Figura 10A foi utilizada para o desenho de iniciadores “forward” buscando especificidade para a amplificação de fragmentos de cicloartenol sintases (CS; VZO1035) e de fragmento de triterpeno sintases (TS; VZO1037).

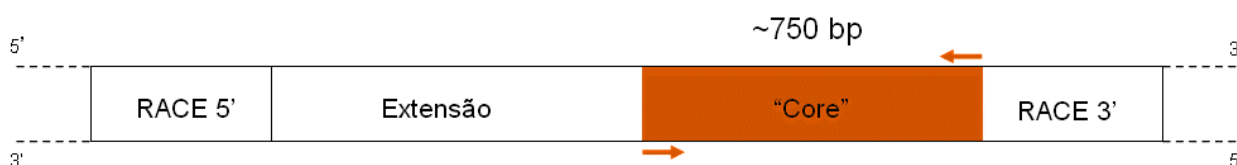


Figura 9. Amplificação de fragmentos “core” de oxidoesqualeno ciclases. A caixa branca representa a região codificadora e as linhas pontilhadas representam as regiões não codificadoras 5' e 3'. A região laranja representa o fragmento “core” a ser amplificado (~750 pb) e as setas laranjas indicam a direção e a região de anelamento dos iniciadores degenerados utilizados na amplificação.

Inicialmente, a amplificação de fragmentos do tamanho esperado de cerca de 750 pb ocorreu apenas quando foi utilizado o par de oligonucleotídeos iniciadores VZO1035 e VZO1036 (Figura 10B), possivelmente de maior especificidade para cicloartenol sintases. Por isso, foram desenhados outros iniciadores (VZO1040, VZO1041, VZO1042), a partir de domínios conservados, na tentativa de amplificar genes de oxidoesqualeno ciclases em geral, uma vez que a amplificação com os iniciadores baseados nas sequências de triterpeno sintases não ocorreu. Porém, novamente, não foi observada amplificação com estes outros iniciadores (dados não mostrados).

Em seguida, diferentes estratégias de amplificação foram realizadas variando-se as condições das reações de PCR e utilizando-se RNA extraído de outros exemplares de *M. ilicifolia* que apresentaram maior produção de friedelina por análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (colaboração com o grupo da Profa. Dra. Maysa Furlan, Instituto de Química, UNESP, Araraquara). A amplificação utilizando os iniciadores mais específicos para triterpeno sintases (VZO1037 e VZO1036) foi realizada com sucesso (Figura 10B) quando foi utilizado o RNA extraído de outro exemplar de *M. ilicifolia* que apresentou maior produção de friedelina.

Os fragmentos gerados nas PCRs foram purificados e submetidos ao processo de clonagem no vetor pTZ57R/T, sendo que após a transformação em *E. coli*, as clonagens foram confirmadas em diversas colônias por reações de PCR de colônias e por diagnóstico de restrição.

Um dos resultados da PCR de colônias é exemplificado na Figura 10C e, como pode ser observado, apenas as colônias numeradas como 4 e 5 não apresentaram inserto, enquanto todas as outras colônias apresentaram um produto de amplificação do tamanho esperado de aproximadamente 850 pb.

A extração de DNA plasmidial e o diagnóstico de restrição foram realizados com as mesmas colônias que apresentaram, por PCR de colônia, o inserto clonado. A Figura 10D exemplifica a verificação, por eletroforese, de bandas de tamanho correspondente ao vetor digerido (2886 pb) e de bandas de tamanho esperado do fragmento liberado na digestão (~750 pb).

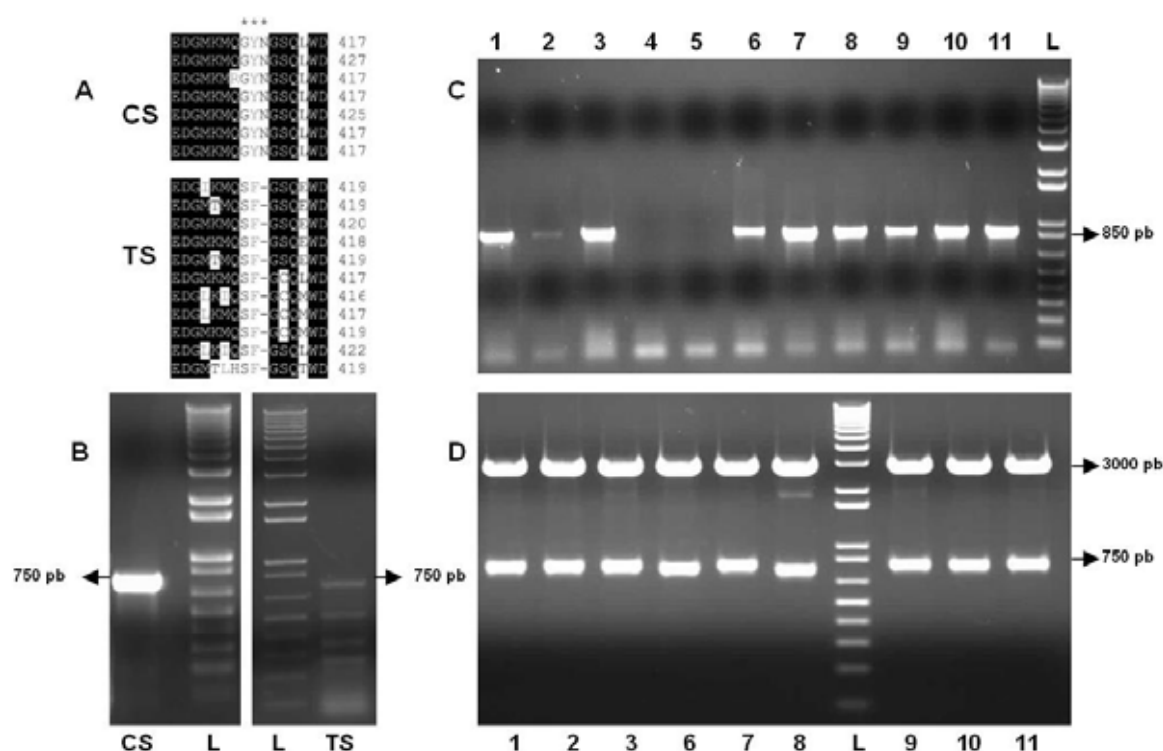


Figura 10. Estratégia de clonagem dos fragmentos “core” dos genes de OSCs das folhas de *M. ilicifolia*. Região de anelamento dos iniciadores “forward”, reação de PCR e confirmação da clonagem. A) Região conservada de resíduos de aminoácidos entre os grupos de cicloartenol sintases (bloco superior) ou triterpeno sintases (bloco inferior:) (GUHLING et al. 2006). B) Amplificação de genes de oxidoesqualeno ciclasas por RT-PCR utilizando iniciadores degenerados para cicloartenol e triterpeno sintase: CS e TS, respectivamente e L= Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen). C) Exemplo de gel de PCR de alguns clones analisados, mostrando amplificação do inserto (amostras 1 a 3 e 6 a 11) de cerca de 850 pb, ou ausência do inserto (amostras 4 e 5). D) Exemplo de confirmação da clonagem das mesmas colônias por diagnóstico de restrição (*Bam*HI/*Eco*RI) apresentando bandas do vetor e do inserto (cerca de 750 pb).

Das colônias em que a presença do inserto foi confirmada pelas duas técnicas apresentadas, o DNA plasmidial extraído foi utilizado para sequenciamento automático com os iniciadores M13F e M13R. Para avaliar a confiabilidade das sequências de nucleotídeos obtida foi utilizado o software “Sequence Scanner v 1.0”. Com o auxílio do editor “BioEdit Sequence Alignment Editor v 7.0.9.0”, foram retiradas de cada sequência as regiões de bases pertencentes ao vetor para que somente as sequências clonadas do cDNA das folhas de *M. ilicifolia* fossem analisadas. De forma geral, os dados de clonagem dos fragmentos “core” de oxidoesqualeno ciclasas obtidos podem ser resumidos da seguinte forma (Tabela 8):

Tabela 8. Dados da clonagem de fragmentos “core”.

Características	Fragmentos CS	Fragmentos TS
Par de iniciadores	VZO1035+VZO1036	VZO1037+VZO1036
Colônias obtidas	~350/placa	~350/placa
Colônias analisadas	100	260
Clones sequenciados	61	82
Sequências analisadas	45	79

Para analisar a cobertura e, também, agrupar as sequências de fragmentos “core” obtidas, todas as sequências de nucleotídeos foram alinhadas utilizando-se o programa ClustalW2 (THOMPSON et al., 1994), por meio do qual foi possível obter um agrupamento (Figura 11) entre os contigs de todas as sequências de cada grupo mostrando a formação de 6 grupos (CS4, TS5, TS6, TS12, CS19 e TS46) que indicaram diferenças de identidade entre si, como mostra a tabela 9. O grupo nomeado como TS46 foi identificado em um rastreamento já no final deste projeto, por isso, ainda não foram realizadas as extensões para obtenção das extremidades 5' e 3'.

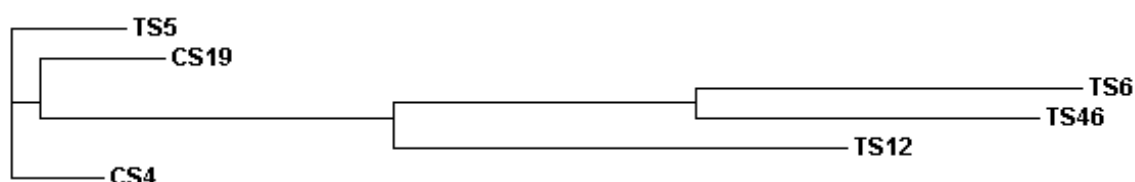


Figura 11. Agrupamento dos fragmentos “core” obtido com o programa ClustalW2. Seis diferentes grupos foram observados e analisados no BlastX. Os grupos nomeados CS4 e TS5 apresentaram maior identidade com sequências descritas de β -amirina sintase; o grupo CS19 apresentou maior identidade com sequências de β -amirina, glutinol, isomultiflorenol e damarenediol sintase; o grupo TS12, com β -amirina e lupeol sintases; e os grupos TS6 e TS46 apresentaram maior identidade com as sequências de cicloartenol sintase de diversas espécies. TS: triterpeno sintases e CS: cicloartenol sintases.

Tabela 9. Identidade entre as sequências de DNA dos fragmentos core de OSCs clonados de *M. ilicifolia*, em porcentagem.

	TS5	CS19	TS6	TS46	TS12
	%	%	%	%	%
CS19	91,6	-	-	-	-
TS6	59,5	62,7	-	-	-
TS46	62,0	63,3	76,2	-	-
TS12	69,3	69,1	63,3	63,6	-
CS4	93,2	91,5	62,4	64,6	69,7

As sequências também foram analisadas no programa Blastn que mostrou alta identidade e cobertura das sequências obtidas neste trabalho com outras oxidoesqualeno ciclases depositadas no GenBank. Tendo como partida análises feitas com o programa Blastn, foi possível confirmar que os fragmentos “core” clonados nesta primeira etapa do projeto representam partes de genes de oxidoesqualeno ciclases uma vez que apresentaram identidade com sequências de enzimas OSCs já descritas, como β -amirina, cicloartenol sintase, lupeol sintase, entre outras de várias espécies vegetais.

É importante lembrar que apesar de terem sido utilizados iniciadores possivelmente mais específicos para a amplificação de fragmentos de cicloartenol sintases (CS; VZO1035) e triterpeno sintases (TS; VZO1037) desenhados em regiões características de cada tipo de oxidoesqualeno ciclase, na prática não foi observada essa especificidade na amplificação, uma vez que fragmentos core obtidos com os iniciadores específicos para triterpeno sintases revelou fragmentos com alta identidade tanto para triterpeno como cicloartenol sintases, enquanto os fragmentos core obtidos com o iniciador mais específico para cicloartenol sintases revelou fragmentos com alta identidade apenas com triterpeno sintases.

4.3. Amplificação da extremidade 3' do cDNA de OSCs

Para a amplificação das extremidades 3' do cDNA, foram utilizados iniciadores “forward” gene específicos desenhados para cada grupo dos fragmentos “core”, e um iniciador “reverse” universal AUAP fornecido no kit de RACE 3' (Invitrogen), levando à amplificação de fragmentos de aproximadamente 600 pb, como mostra a Figura 12.

O alinhamento das sequências dos fragmentos “core” dos grupos CS4, TS5 e CS19 (Figura 11) revelou que estes grupos apresentam alta similaridade, então, foram desenhados iniciadores em regiões com pequenas diferenças entre eles, na tentativa de amplificar os fragmentos da extremidade 3' de cada grupo separadamente.



Figura 12. Amplificação de fragmentos da extremidade 3' de oxidoesqualeno ciclases. A caixa representa a região codificadora e as linhas pontilhadas representam as regiões não codificadoras 5' e 3'. A região laranja representa o fragmento “core” já obtido. A região verde representa o fragmento extremidade 3' a ser amplificado (~550 pb) e as setas verdes indicam a direção e a região de anelamento dos iniciadores específicos “forward” e do universal AUAP “reverse” ao cDNA sintetizado com o adaptador AP utilizados na amplificação.

As amplificações foram realizadas com os iniciadores específicos para os grupos CS4, TS5, TS6, TS12 e CS19, sendo observados fragmentos de tamanhos variados e uma banda com intensidade um pouco maior em aproximadamente 600 pb (dados não mostrados). Para aumentar a especificidade da amplificação, foram realizadas reações de “nested PCR” com os produtos destas primeiras reações de PCR, utilizando outros iniciadores “forward” gene específicos, que anelam em uma região mais interna dos fragmentos gerados. Foram, então, observadas bandas intensas em torno de 550 pb (Figura 13), as quais foram utilizadas para clonagem.

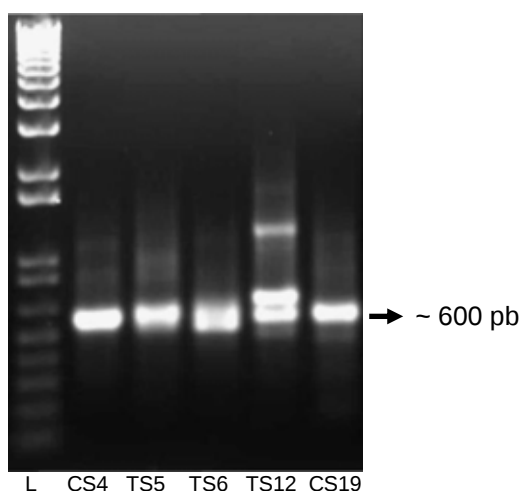


Figura 13. Amplificação das extremidades 3' dos cDNAs obtidos: “Nested PCR” com iniciadores específicos de regiões mais internas, indicando a amplificação de uma banda intensa com cerca de 550 pb para os grupos CS4, TS5, TS6, TS12 e CS19 ; L: Marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen).

Os fragmentos obtidos foram então clonados, sequenciados e analisados da mesma forma que os fragmentos clonados até então. A análise no Blastn sugeriu que os grupos CS4, TS5, TS12 e CS19 apresentaram alta identidade (70%) com β -amirina e lupeol sintase de diferentes espécies vegetais. O grupo TS6 apresentou alta identidade (70 - 80%) com cicloartenol sintases de outras espécies.

Desta forma, é possível afirmar que os iniciadores e a metodologia de amplificação baseada em RT-PCR foram eficientes para a clonagem de fragmentos gênicos pertencentes à família das enzimas oxidoesqualeno ciclases.

4.4. Extensão no sentido 5' dos fragmentos “core”

A estratégia para obtenção da região 5' do cDNA foi baseada em metodologias descritas na literatura (WANG *et al.*, 2010), nas quais, antes da realização de RACE 5', são realizadas extensões 5' dos fragmentos core. Além disso, extremidade 5' possui cerca de 1300 pb, o que torna mais viável a amplificação de dois fragmentos separadamente.

Após as análises das sequências dos fragmentos “core”, foram desenhados iniciadores “reverse” gene específicos para cada grupo formado. Um iniciador “forward” degenerado descrito previamente por Guhling *et al.* (2006) foi utilizado como par para cada iniciador “reverse” específico, gerando fragmentos de cerca de 850 pb, como mostra a Figura 14.

O alinhamento das sequências dos fragmentos “core” dos grupos CS4, TS5 e CS19 revelou que estes grupos apresentam alta similaridade. Assim, foram desenhados iniciadores em regiões com pequenas diferenças, na tentativa de se amplificar os fragmentos da extensão 5’ de cada grupo separadamente.



Figura 14. Amplificação de fragmentos da extensão 5’ de oxidoesqualeno ciclases. A caixa representa a região codificadora e as linhas pontilhadas representam as regiões não codificadoras 5’ e 3’. As regiões laranja e verde representam, respectivamente, os fragmentos “core” e 3’, já obtidos. A região azul representa o fragmento da extensão 5’ a ser amplificado (~850 pb) e as setas azuis indicam a direção e a região de anelamento do iniciador degenerado “forward” e iniciadores “reverse” específicos para cada grupo (dentro da região “core”).

Foram realizadas reações de amplificação do fragmento da extensão 5’ para os grupos CS4, TS5, TS6, TS12 e CS19. Como mostra a Figura 15A, foram observadas bandas de baixa intensidade no gel, por isso, foram realizadas reações de reamplificação (Figura 15B) com os produtos gerados na PCR, com o objetivo de aumentar a quantidade de produto para a clonagem.

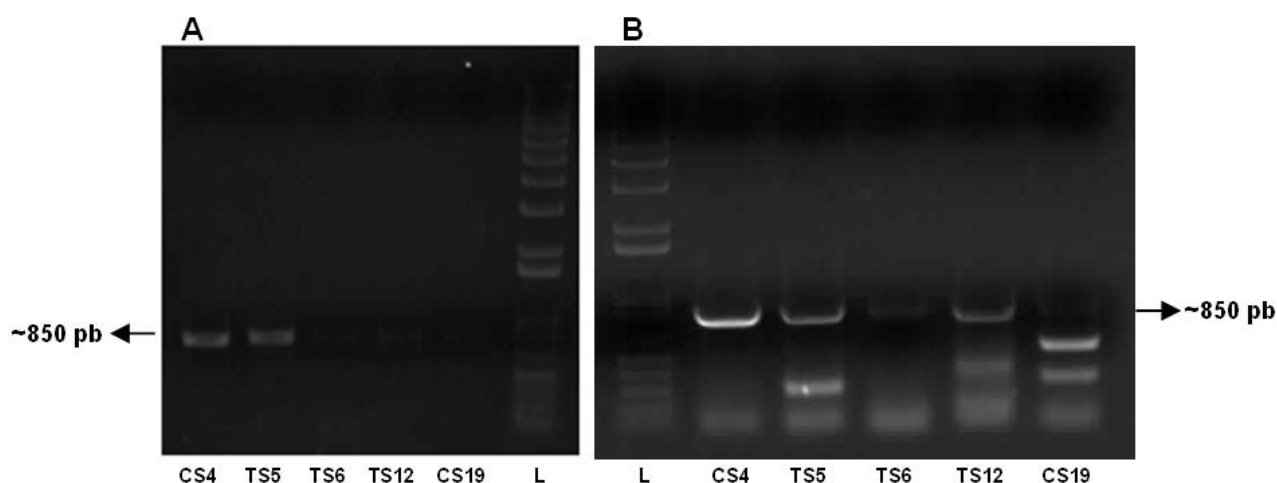


Figura 15. Amplificação dos fragmentos de extensão 5’ do core. A) PCR dos grupos CS4, TS5, TS6, TS12 e CS19 que amplificaram (bandas fracas) o fragmento de tamanho esperado; B) Reamplificação dos produtos da PCR em A, gerando um fragmento de cerca de 850 pb de maior intensidade, L: Marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen).

Os fragmentos foram então clonados em pTZ57R/T, sequenciados e analisados pela mesma metodologia que os fragmentos “core”. A análise utilizando Blastn sugeriu que os grupos CS4, TS5, TS6, TS12 e CS19 podem ser fragmentos

com alta identidade (70 a 80%) com OSCs de diversas espécies vegetais, como β -amirina, multifuncional triterpeno e cicloartenol sintases.

As sequências correspondentes aos fragmentos da extensão 5' obtidas foram utilizadas para o desenho de iniciadores "reverse" gene específicos para realização do RACE 5'.

4.5. Amplificação das extremidades 5' dos cDNAs de OSCs

Para a amplificação das extremidades 5' do cDNA, foram utilizados iniciadores "reverse" gene específicos desenhados para cada grupo dos fragmentos da extensão 5', e um iniciador "forward" universal AUAP fornecido no kit de RACE 5' (Invitrogen), levando à amplificação de fragmentos de aproximadamente 600 pb, como mostra a Figura 16.

O alinhamento das sequências dos fragmentos da extensão 5' dos grupos CS4 e TS5 mostram alta identidade, por isso, foram utilizados os mesmos iniciadores "reverse" específicos para amplificação da extremidade 5' desses dois grupos. O grupo CS19 também apresentou alta identidade com os grupos CS4 e TS5 e, então, foram desenhados iniciadores em regiões com pequenas diferenças na tentativa de amplificar os fragmentos da extremidade 5' desse grupo separadamente.



Figura 16. Amplificação de fragmentos da extremidade 5' de oxidoesqualeno ciclases. A caixa representa a região codificadora e as linhas pontilhadas representam as regiões não codificadoras 5' e 3'. As regiões laranja, verde e azul representam, respectivamente, os fragmentos "core", 3' e extensão 5' já obtidos. A região amarela representa o fragmento da extremidade 5' a ser amplificado (~600 pb) e as setas amarelas indicam a direção e a região de anelamento do iniciador universal "forward" (AUAP) com o adaptador AP e os iniciadores "reverse" específicos.

As amplificações foram realizadas com os iniciadores específicos para os grupos CS4/TS5, TS6, TS12 e CS19, sendo observados fragmentos de tamanhos variados e uma banda com intensidade um pouco maior em aproximadamente 600 pb (dados não mostrados). Para aumentar a especificidade da amplificação, foram

realizadas reações de “nested PCR” com os produtos destas primeiras reações de PCR, utilizando outros iniciadores “reverse” gene específicos que anelam em uma região mais interna dos fragmentos gerados. Foram, então, observadas bandas intensas em torno de 600 pb (Figura 17), as quais foram utilizadas para clonagem.

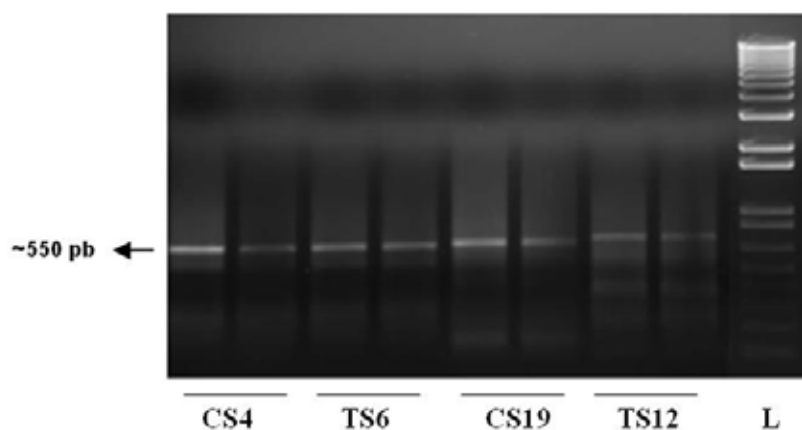


Figura 17. Amplificação das extremidades 5' dos cDNAs obtidos (RACE 5'). “Nested PCR” com iniciadores específicos de regiões mais internas, indicando a amplificação de uma banda intensa com cerca de 550 pb para os grupos CS4/TS5, TS6, TS12 E CS19 ; L: ladder 1 kb DNA plus (Invitrogen).

4.6. Montagem virtual dos fragmentos: “core” + RACE 3’

Como os iniciadores “forward” específicos utilizados na RACE 3’ foram desenhados de acordo com regiões conhecidas das extremidades 3’ dos fragmentos “core” (Figura 18A), a montagem virtual dos fragmentos foi realizada sobrepondo-se as extremidades até a região dos iniciadores, observando que essas regiões devem apresentar alta identidade, como mostra a Figura 18B.

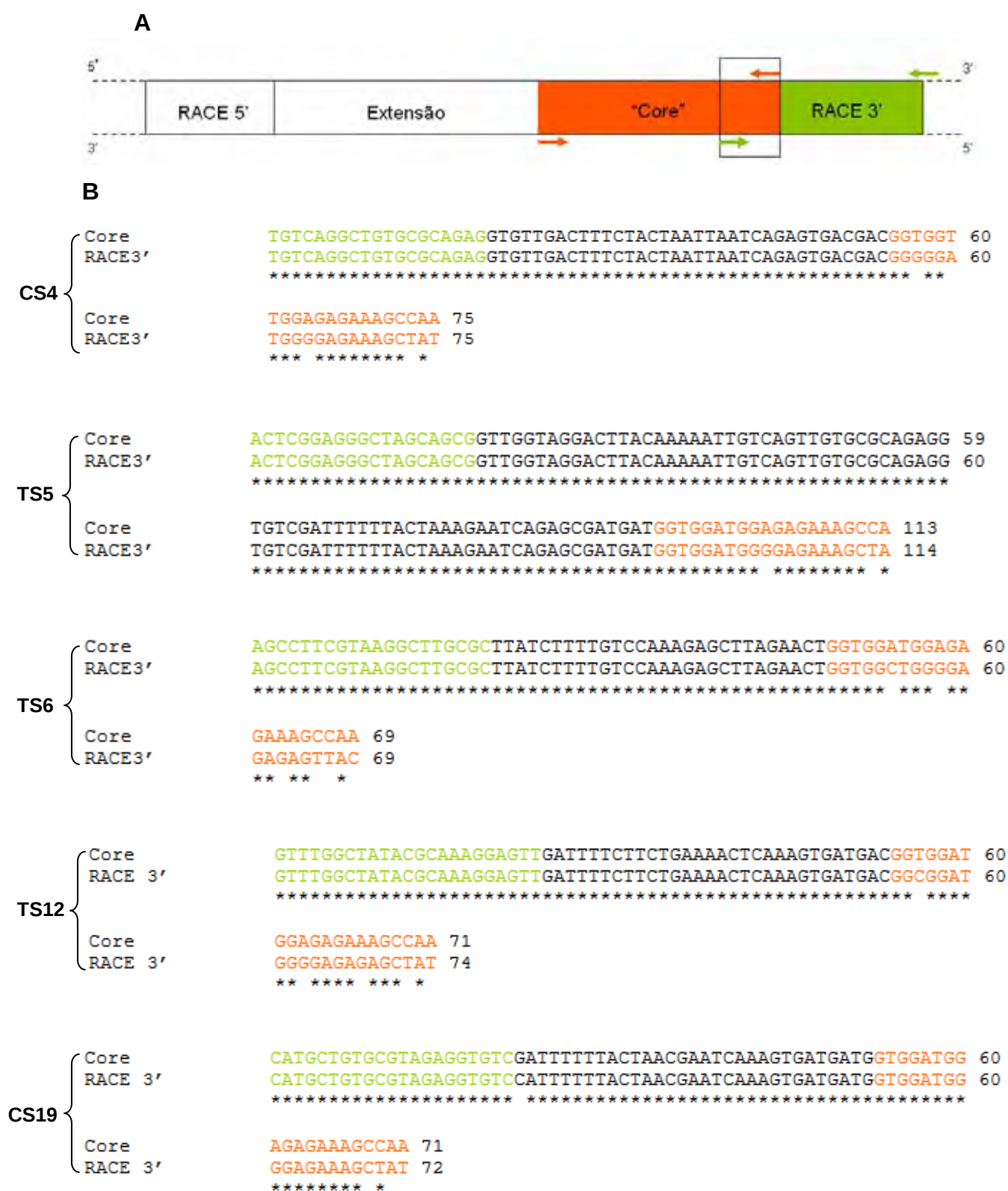


Figura 18. Montagem virtual dos fragmentos “core” com os fragmentos da RACE 3’. A) A seleção na figura indica a região na qual o iniciador degenerado (laranja) e iniciador específico (verde) de cada grupo foram desenhados. B) Alinhamento múltiplo (realizado com ClustalW2) para verificar a similaridade entre as regiões de sobreposição de cada um dos grupos: CS4, TS5, TS6, TS12 e CS19.

A montagem destes dois fragmentos gerou fragmentos virtuais de cerca 1300 pb que, por meio da ferramenta de análise Blastn indicaram alta identidade (70%) com cicloartenol sintases de diversas espécies para o grupo TS6, alta identidade (70% - 80%) com triterpeno sintase para os grupos CS4, TS5, TS12 e CS19.

4.7. Montagem virtual dos Fragmentos: Extensão 5' + “Core” + RACE 3'

Como os iniciadores “reverse” específicos utilizados na extensão 5' foram desenhados de acordo com regiões conhecidas das extremidades 5' dos fragmentos “core” (Figura 19A), a montagem virtual dos fragmentos foi realizada sobrepondo-se as extremidades até a região dos iniciadores, observando que essas regiões devem apresentar alta identidade como mostra a Figura 19B.

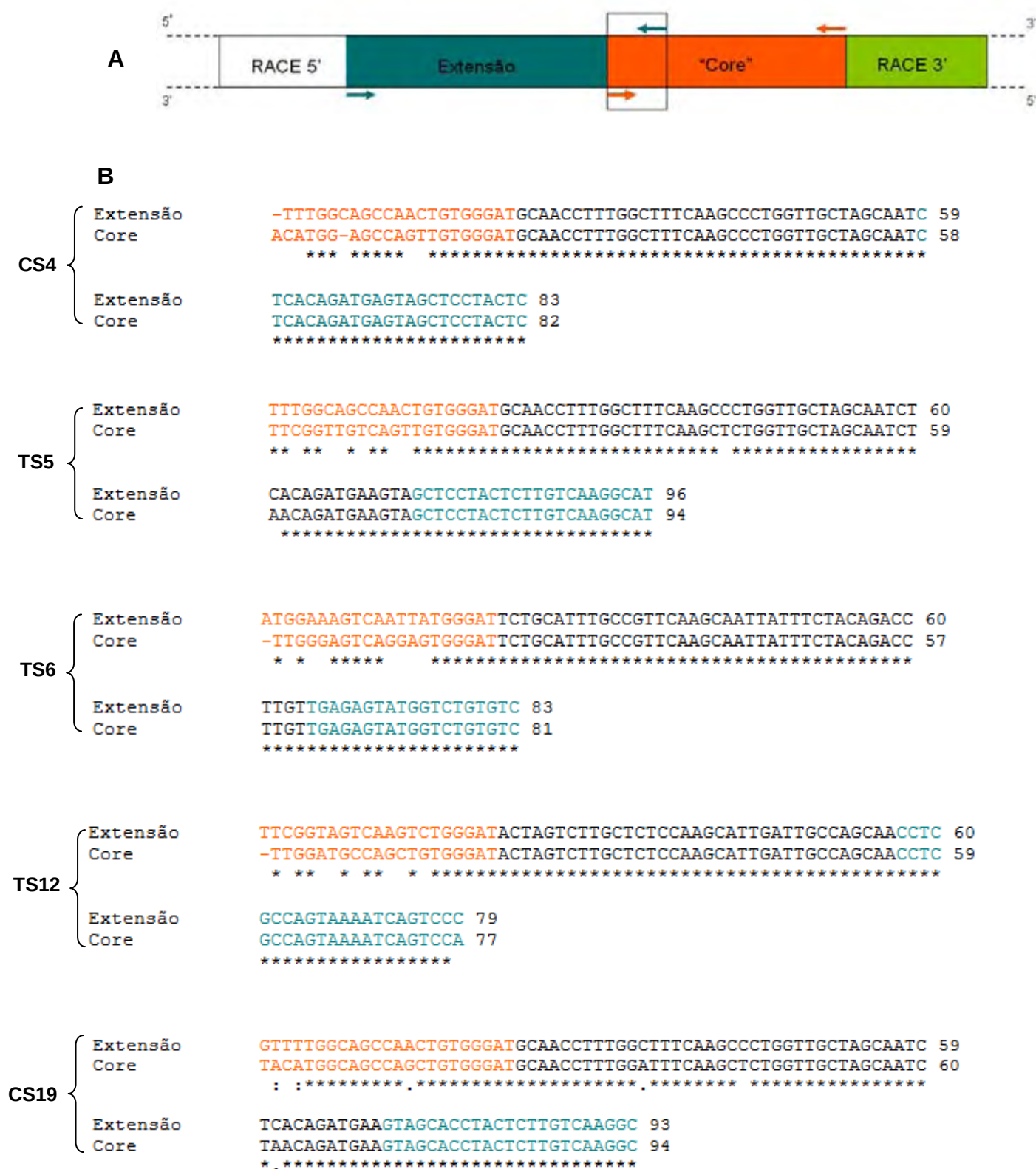


Figura 19. Montagem virtual dos fragmentos da extensão 5' com os fragmentos core. A) A seleção na figura indica a região na qual o iniciador degenerado (laranja) e iniciador específico (azul) de cada grupo foram desenhados. B) Alinhamento realizado com ClustalW2 para verificar a similaridade entre as regiões de sobreposição de cada um dos grupos: CS4, TS5, TS6, TS12 e CS19.

4.8. Montagem virtual de todos fragmentos (RACE 5' + Extensão 5' + "Core" + RACE 3')

Como os iniciadores "forward" específicos utilizados na RACE 5' foram desenhados de acordo com regiões conhecidas das extremidades 5' dos fragmentos da extensão 5' (Figura 20A), a montagem virtual dos fragmentos foi realizada sobrepondo-se as extremidades até a região dos iniciadores, observando que essas regiões devem apresentar alta identidade como mostra a Figura 20B.



Figura 20. Montagem virtual dos fragmentos da extremidade 5' com os fragmentos da extensão 5'. A) A seleção na figura indica a região na qual o iniciador degenerado (azul) e o iniciador específico (amarelo) de cada grupo foram desenhados. B) Alinhamento realizado com ClustalW2 para verificar a similaridade entre as regiões de sobreposição de cada um dos grupos: CS4/TS5, TS6, TS12 e CS19.

A partir dos fragmentos virtualmente montados, foram obtidas as sequências traduzidas das enzimas OSCs e o alinhamento múltiplo utilizando a ferramenta ClustalW2 revelou uma identidade acima de 90% entre os fragmentos CS4, TS5 e CS19, enquanto que a similaridade entre CS4, TS5 ou CS19 com TS6 ou TS12 foi de cerca de 30%, indicando a maior proximidade entre as três primeiras sequências e maior distanciamento com a sequência teórica do fragmento TS6. Já a similaridade entre as sequências TS6 e TS12 foi de 21%, indicando que esses grupos são os mais diferentes entre si.

As mesmas sequências montadas virtualmente foram submetidas ao BlastX que demonstrou que as construções virtuais apresentaram alta similaridade com sequências de oxidoesqualeno ciclases de várias espécies depositadas no GenBank. Desta forma, é possível afirmar que a metodologia de amplificação baseada em RT-PCR e as extensões utilizando os sistemas RACE 3' e RACE 5' foram eficientes para a clonagem de genes pertencentes à família das enzimas oxidoesqualeno ciclases da espécie *M. ilicifolia*.

De forma geral, os dados de clonagem dos fragmentos da RACE 3', da extensão 5' e da RACE 5' de oxidoesqualeno ciclases obtidos podem ser resumidos da seguinte forma (Tabela 10):

Tabela 10. Dados das clonagens dos fragmentos obtidos para RACE 3', extensão 5' e RACE 5'.

Fragmento	Grupo	Colônias obtidas	Colônias	Clones sequenciados	Sequências analisadas
			verificadas para presença do inserto		
RACE 3'	CS4	~ 350	20	10	8
	TS5	~ 350	20	10	10
	TS6	~ 350	20	10	7
	TS12	~ 350	10	6	6
	CS19	~ 350	10	4	4
Extensão 5'	CS4	~ 350	20	10	9
	TS5	~ 350	20	9	8
	TS6	~ 350	20	7	4
	TS12	~ 350	20	7	3
	CS19	~ 350	20	7	6
RACE 5'	CS4 / TS5	~ 350	20	5	4
	TS6	~ 350	20	12	12
	TS12	~ 350	20	5	4
	CS19	~ 350	20	15	12

4.9. Amplificação das ORFs de oxidoesqualeno ciclases e clonagem no vetor pTZ57R/T

As montagens virtuais foram utilizadas no desenho dos iniciadores específicos para amplificação das ORFs completas das prováveis oxidoesqualeno ciclases. Para tanto, as montagens foram alinhadas no programa ClustalW2 e iniciadores “forward” foram desenhados nas extremidades 5’, próximo ao códon de iniciação (AUG), e iniciadores “reverse” foram desenhados nas extremidades 3’, próximo ao códon de terminação (UAA/UGA/UAG), como mostra o esquema na Figura 21A. Como os grupos CS4, TS5 e CS19 apresentaram alta similaridade (>90%) entre suas sequências gênicas montadas, foram desenhados iniciadores específicos comuns para amplificação das ORFs desses grupos. Foram, também, desenhados iniciadores específicos para amplificação das ORFs dos grupos TS6 e TS12.

As reações de PCR foram realizadas com os iniciadores específicos e a amplificação foi observada apenas para os grupos CS4 e TS6, sendo que o grupo TS12 não apresentou amplificação (Figura 21B). Os fragmentos obtidos com tamanho esperado de cerca de 2500 pb foram clonados no vetor de clonagem pTZ57R/T, e a confirmação da clonagem foi realizada por PCR de colônias (Figura 21C) e diagnóstico de restrição (Figura 21D).

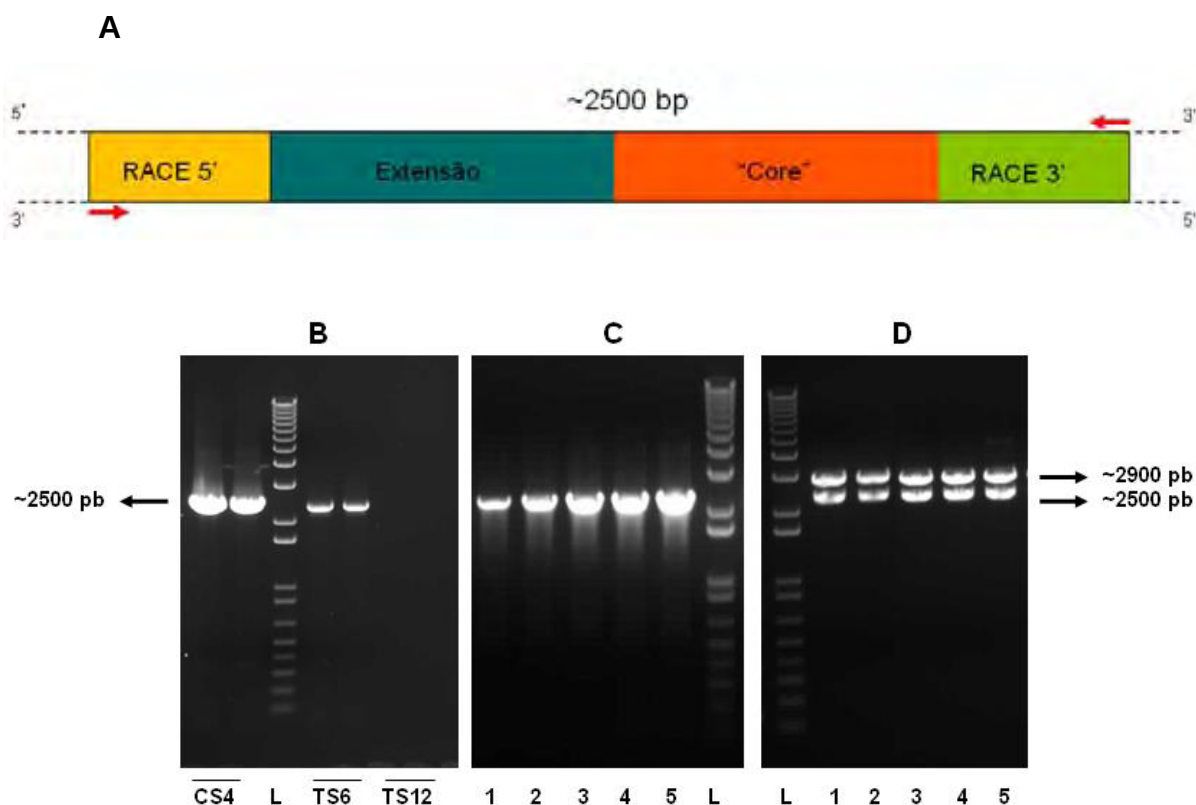


Figura 21. A) Clonagem das ORFs de oxidoesqualeno ciclasas. A caixa representa a região codificadora com cerca de 2500 pb, em cujas extremidades foram desenhados os iniciadores específicos, “forward” e “reverse”, indicados pelas setas vermelhas. B) Amplificação das ORFs de oxidoesqualeno ciclasas para os grupos CS4, TS6 e para o grupo TS12, que não amplificou. C) Exemplo de confirmação da clonagem por PCR de colônias com os iniciadores M13 do cassete de clonagem, gerando um fragmento de ~2500 pb. D) Diagnóstico de restrição com as enzimas *Bam*HI + *Eco*RI, liberando uma banda referente ao inserto (~2500 pb) e outra referente ao vetor pTZ57R/T (~2900 pb).

4.10. Sequenciamento completo das ORFs de oxidoesqualeno ciclasas obtidas

Após a confirmação da clonagem, os plasmídeos que apresentaram insertos foram submetidos ao sequenciamento utilizando os iniciadores universais M13, presentes nas extremidades do cassete de clonagem do vetor pTZ57R/T. Nesta etapa do sequenciamento, foi possível analisar as extremidades 5' e 3' das ORFs de cada clone dos grupos CS4 e TS6.

O alinhamento múltiplo, com o programa ClustalW2, entre as sequências das extremidades 5' ou 3' do grupo TS6, revelou que todas os clones analisados neste grupo são idênticos. Já o alinhamento entre as sequências das extremidades 5' ou 3' do grupo CS4 revelou diferenças entre clones analisados. Os diferentes clones do

grupo CS4 (denominados: CS4.1, CS4.5 e CS4.11) e um clone do grupo TS6 foram sequenciados internamente com iniciadores específicos para o grupo.

De forma geral, os dados de clonagem das extremidades 5' e 3', de oxidoesqualeno ciclases obtidos podem ser resumidos da seguinte forma (Tabela 11):

Tabela 11. Dados das clonagens das ORFs completas no vetor pTZ57R/T e análises realizadas das extremidades 5' e 3'.

Fragmento	Grupo	Colônias obtidas	Colônias verificadas	Clones sequenciados	Sequências analisadas
			para presença do inserto		
Extremidade 5' e 3'	CS4	~400	60	50	46
Extremidade 5' e 3'	TS6	~400	108	50	42

Após o sequenciamento das extremidades e regiões internas, as sequências foram montadas virtualmente com o programa DNA Baser (versão 3.4.5.2), a fim de se obter as sequências das ORFs completas.

Como mostra a Figura 22, foram observados nas oxidoesqualeno ciclases clonadas quatro motivos QW, os quais são características da superfamília das OSCs (GUHLING et al., 2006),. Foram observados ainda o sítio catalítico DCTAE e a região característica de cicloartenol sintases (GYN) na sequência TS6 e uma região característica de triterpeno sintases (SFG) nas sequências CS4. As sequências de aminoácidos das OSCs obtidas foram alinhadas com o programa ClustalW2 demonstrando que as sequências do grupo CS4 (CS4.1, CS4.5 e CS4.11) apresentam 98% de identidade entre si e 51% de identidade com a ORF do grupo TS6.

```

CS4.5 1 MWKIKIAL---RGNCPTYNEYLYTTNDFVGRQIWEFDPS--GTPEELTEIEEARRKFTENRYEVKPSADLLWMQFLRKNFQ--TIPPLRIGEKEQVITYEDVTTALRR
CS4.11 1 MWKIKIAL---RGNCPTYNEYLYTTNDFVGRQIWEFDPS--GTPEELTEIEEARRKFTENRYEVKPSADLLWMQFLRKNFQ--TIPPLRIGEKEQVITYEDVTTALRR
CS4.1 1 MWKIKIAL---RGNCPTYNEYLYTTNDFVGRQIWEFDPS--GTPEELTEIEEARRKFTENRYEVKPSADLLWMQFLRKNFQ--TIPPLRIGEKEQVITYEDVTTALRR
TS6 1 MWKIKIAL---RGNCPTYNEYLYTTNDFVGRQIWEFDPS--GTPEELTEIEEARRKFTENRYEVKPSADLLWMQFLRKNFQ--TIPPLRIGEKEQVITYEDVTTALRR

CS4.5 105 PSFFSALQASDGHWPAENAGVSFFLPPIFCLYITGHLNSIITPEHRKEILRFIYNHONEDGGWGIHIEGHSTVFATAFTVCMRILGVGH--DEDACARARKWILDRGG
CS4.11 105 PSFFSALQASDGHWPAENAGVSFFLPPIFCLYITGHLNSIITPEHRKEILRFIYNHONEDGGWGIHIEGHSTVFATAFTVCMRILGVGH--DEDACARARKWILDRGG
CS4.1 105 PSFFSALQASDGHWPAENAGVSFFLPPIFCLYITGHLNSIITPEHRKEILRFIYNHONEDGGWGIHIEGHSTVFATAFTVCMRILGVGH--DEDACARARKWILDRGG
TS6 106 INFYSTIQAADGHWPGIYGGPMELLHSLIITLHITGALNWLREHOREMCRVLYNHQNSDGGWGIHIEGHSTVFATAFTVCMRILGVGH--DEDACARARKWILDRGG

CS4.5 213 ITYMASWGKTWFSVLGIFDNYGCNMPPEFWILPSYLPHPAKMWCYCRMVYMPMSYLYGKRFVAPITPLILQREELHTQPYHEIEWRKMRRHRCACEDLYFPHSLIQNF
CS4.11 213 ITYMASWGKTWFSVLGIFDNYGCNMPPEFWILPSYLPHPAKMWCYCRMVYMPMSYLYGKRFVAPITPLILQREELHTQPYHEIEWRKMRRHRCACEDLYFPHSLIQNF
CS4.1 212 ITYMASWGKTWFSVLGIFDNYGCNMPPEFWILPSYLPHPAKMWCYCRMVYMPMSYLYGKRFVAPITPLILQREELHTQPYHEIEWRKMRRHRCACEDLYFPHSLIQNF
TS6 216 ATATISWGKMLSVLGIVYEWITGNFPPPEVILCEVYLPHPAKMWCYCRMVYMPMSYLYGKRFVAPITPLILQREELHTQPYHEIEWRKMRRHRCACEDLYFPHSLIQNF

CS4.5 323 LWDLSLYVASEPLLTRWPFISKIRERALEKAMEHIHYEDENSRYITIGCVEKALCMLCCWVEDPNGEYFKKHLARIPDYLVVAEDGMKVVSFGSOLWDATFGFOALVASNLT
CS4.11 323 LWDLSLYVASEPLLTRWPFISKIRERALEKAMEHIHYEDENSRYITIGCVEKALCMLCCWVEDPNGEYFKKHLARIPDYLVVAEDGMKVVSFGSOLWDATFGFOALVASNLT
CS4.1 322 LWDLSLYVASEPLLTRWPFISKIRERALEKAMEHIHYEDENSRYITIGCVEKALCMLCCWVEDPNGEYFKKHLARIPDYLVVAEDGMKVVSFGSOLWDATFGFOALVASNLT
TS6 326 LWDLSLYVASEPLLTRWPFISKIRERALEKAMEHIHYEDENSRYITIGCVEKALCMLCCWVEDPNGEYFKKHLARIPDYLVVAEDGMKVVSFGSOLWDATFGFOALVASNLT

CS4.5 433 DEVAPTL---VKAYDFIKKCOVRDNPSCNFEKMFHRHISKGSWTFSDQDHGWLSDCTAEALKCCLLAATMPEELVGEKLDPOWIFESVNIILSLQEPKTGGLAGNEPVRA
CS4.11 433 DEVAPTL---VKAYDFIKKCOVRDNPSCNFEKMFHRHISKGSWTFSDQDHGWLSDCTAEALKCCLLAATMPEELVGEKLDPOWIFESVNIILSLQEPKTGGLAGNEPVRA
CS4.1 432 DEVAPTL---VKAYDFIKKCOVRDNPSCNFEKMFHRHISKGSWTFSDQDHGWLSDCTAEALKCCLLAATMPEELVGEKLDPOWIFESVNIILSLQEPKTGGLAGNEPVRA
TS6 434 DVEEYGLCLKRAHNLKDSOVLDCPCDLSFWHRHISKGSWTFSDQDHGWLSDCTAEALKCCLLAATMPEELVGEKLDPOWIFESVNIILSLQEPKTGGLAGNEPVRA

CS4.5 540 GOWMEMLNPMFEFLNIVIEHTYIECTGSSIIAFITLKKLPFGHRTKIDNFIIVNAIRYLEDEQYPDGWSYGNWGCIFYSTMFALGGLAAAGRTYKNCQAVRRGVDFLLI
CS4.11 540 GOWMEMLNPMFEFLNIVIEHTYIECTGSSIIAFITLKKLPFGHRTKIDNFIIVNAIRYLEDEQYPDGWSYGNWGCIFYSTMFALGGLAAAGRTYKNCQAVRRGVDFLLI
CS4.1 539 GOWMEMLNPMFEFLNIVIEHTYIECTGSSIIAFITLKKLPFGHRTKIDNFIIVNAIRYLEDEQYPDGWSYGNWGCIFYSTMFALGGLAAAGRTYKNCQAVRRGVDFLLI
TS6 543 YOWLEFINPFIIFGDIIVITFYIECTSAALCALTLKRFMTTHRRVEDNCLIKAGEFIBRIQENNGSWYSGWCFSGGWFSTIKGLVAGRTYSNCHSLRKAQAILLS

CS4.5 650 NQSDDGWGESYISCPKRYTTPLEGRRSNVQTAWAMLGLLYAGQAERDPTPLHRGAKLLINYQMEEGGYPQOEITGVFKMNCMLHYPIYRNAFFIWAALGEYRKRVPPLPS
CS4.11 650 NQSDDGWGESYISCPKRYTTPLEGRRSNVQTAWAMLGLLYAGQAERDPTPLHRGAKLLINYQMEEGGYPQOEITGVFKMNCMLHYPIYRNAFFIWAALGEYRKRVPPLPS
CS4.1 649 NQSDDGWGESYISCPKRYTTPLEGRRSNVQTAWAMLGLLYAGQAERDPTPLHRGAKLLINYQMEEGGYPQOEITGVFKMNCMLHYPIYRNAFFIWAALGEYRKRVPPLPS
TS6 653 KCLRTGGWGESYISCONRYTNLKGDRPHVTNTGWAMLLIEAGQAERDPTPLHRGAKLLINYQMEEGGYPQOEITGVFKMNCMLHYPIYRNAFFIWAALGEYRKRVPPLPS

CS4.5 760 KGNMAMKINSA
CS4.11 760 KGNMAMKINSA
CS4.1 759 KGNMAMKINSA
TS6 754 YRCRQLQS---
```

Figura 22. Sequências de aminoácidos das OCSs de *M. ilicifolia*. Os quatro motivos QW, são sublinhados por uma linha única. O motivo DCTAE está sublinhado com uma linha dupla. As regiões características de triterpeno (SFG), para sequências dos grupos CS4, e cicloartenol sintases (GYN), para a sequência do grupo TS6, são destacadas por uma caixa vermelha.

4.11. Comparação de sequências de aminoácidos de CS4 e TS6 e suas relações com outros membros da superfamília das OSCs

Um dendograma foi construído utilizando uma sequência deduzida de aminoácidos dos grupos CS4 e TS6, juntamente com outras OSCs de plantas já descritas. As análises utilizando o método “neighbor-joining” (MEGA 5) mostrou que CS4 estão muito próximas de um grupo de enzimas triterpeno sintases, formando um ramo dentro deste grupo e mostrando 59-73% de identidade com enzimas de outras espécies, por exemplo, 73% com β -amirina sintase de *Populus trichocarpa* e *Vitis vinifera* (VvbAS), 64% com lupeol sintase de *Arabidopsis thaliana*, 59% com isomultiflorenol sintase de *Cucumis sativus* (CslMS) (Figura 23). Finalmente, TS6 foi observada em um grupo mais relacionado com um grupo de cicloartenol sintases de várias outras espécies, apresentando identidade de 60-83% com outras sequências de cicloartenol sintases já descritas e caracterizadas.

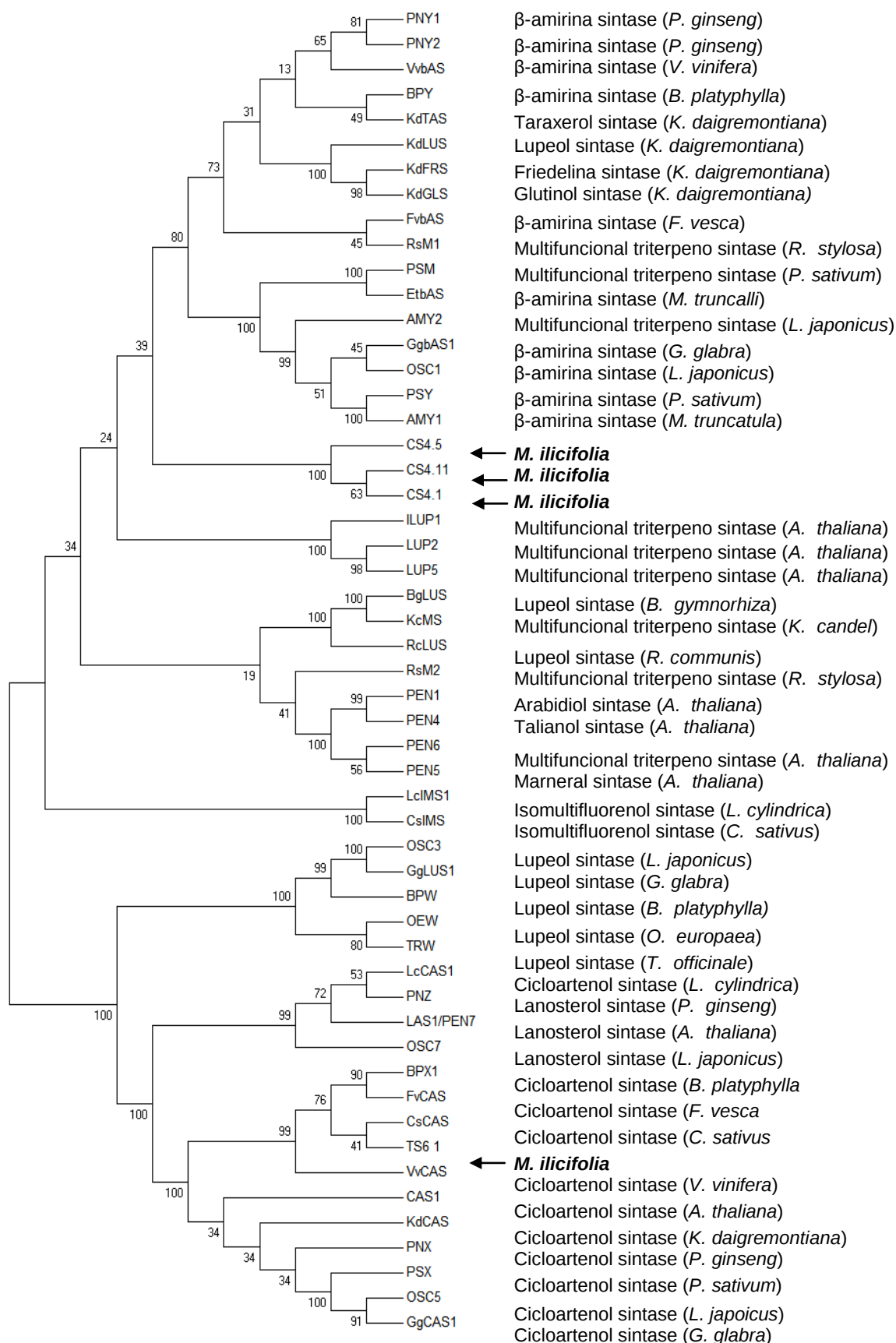


Figura 23. Dendrograma construído com o programa MEGA 5, utilizando o método neighbor-joining e 1000 bootstraps, comparando as novas OSC clonadas de *M. ilicifolia* (TS6, CS4.1, CS4.5, CS4.11) com OSCs já caracterizadas de outras espécies vegetais.

4.12. Subclonagem das ORFs de oxidoesqualeno ciclases no vetor de expressão pYES2

Os plasmídeos contendo as ORFs pertencentes ao grupo CS4 e ao grupo TS6 foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI + *Eco*RI e *Bam*HI + *Xba*I, respectivamente, purificadas do gel e subclonadas no vetor de expressão pYES2. A Figura 23 exemplifica os resultados das digestões do inserto (A) e vetor pYES2 (B) para subclonagem.

A confirmação das subclonagens foi realizada por PCR de colônias, com os iniciadores presentes nos insertos, como exemplifica a Figura 23C, e por diagnóstico de restrição (Figura 23D) utilizando uma enzima presente apenas no cassete de clonagem do vetor (*Hind*III para todos os grupos) e outra presente apenas no inserto (*Xba*I para o grupo TS6 e *Eco*RI para o grupo CS4) seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente.

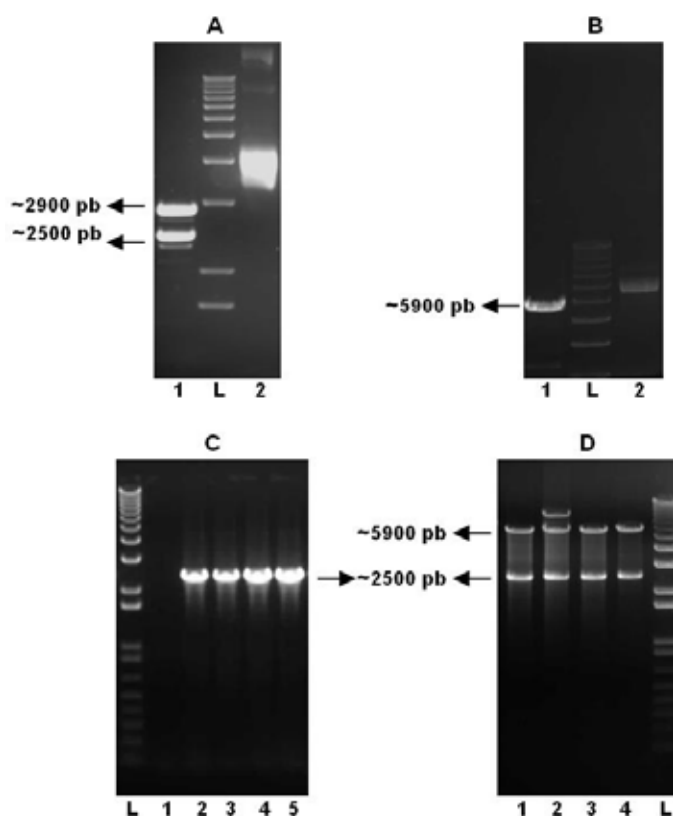


Figura 24. Subclonagem das ORFs em pYES2 e confirmação das subclonagens. A) Digestão do inserto: 1 - Digestão do plasmídeo pTZ57R/T (~2900 pb) liberando o inserto (~2500 pb) e 2 - Plasmídeo não digerido; B) Digestão do vetor: 1 - pYES2 digerido (~5900 pb) e 2 - pYES2 não digerido; 3) Confirmação das subclonagens por PCR de colônia: 1 - Colônia sem a presença de inserto e 2 a 5 - Colônias com a presença de inserto, e D) Diagnóstico de restrição: 1 a 4 - vetor pYES (~5900 pb) e inserto (~2500 pb). Em todos, L = Marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen).

Os plasmídeos resultantes da subclonagem foram, também, extraídos e submetidos ao sequenciamento com o iniciador T7 “forward”, confirmando a direcionalidade correta das ORFs nas novas construções plasmidiais.

As construções plasmidiais das oxidoesqualeno ciclases no vetor pYES2 serão utilizadas futuramente para expressão em *Saccharomyces cerevisiae*, a fim de se analisar os triterpenos produzidos por cada uma das enzimas OScs cujos genes foram clonados.

5. CONCLUSÕES

- A técnica de RT-PCR utilizando o mRNA das folhas de *M. ilicifolia* e iniciadores degenerados possibilitou a amplificação de fragmentos que apresentaram alta identidade com genes de oxidoesqualeno ciclases vegetais;
- A partir destes fragmentos, foram obtidas as extremidades 5' e 3' dos genes destas enzimas;
- A partir das extremidades 5' e 3' foram obtidas as ORFs completas das oxidoesqualeno ciclases;
- O alinhamento entre as sequências de resíduos de aminoácidos permitiu identificar as ORFs clonadas como pertencentes à família de OSCs e caracterizar domínios conservados destas enzimas.
- As comparações entre as ORFs clonadas neste trabalho com outros membros da família das OSCs permitiram afirmar que se tratam de genes de *M. ilicifolia* com alta identidade com genes da mesma família enzimática já descritos em outras espécies vegetais.

6. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct. 1990.

BABIYCHUK, E. et al. Allelic mutant series reveal distinct functions for Arabidopsis cycloartenol synthase 1 in cell viability and plastid biogenesis. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 8, p. 3163-3168, Feb. 2008.

CAO, S.; KINGSTON, D. G. I. Biodiversity conservation and drug discovery: can they be combined? The Suriname and Madagascar experiences. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 8, p. 809-823, Aug. 2009.

CARVALHO, A. C. B. **Plantas medicinais e fitoterápicos**: regulamentação sanitária e proposta de modelo de monografia para espécies vegetais oficializadas no Brasil. 2011. 318 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2011.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. Estrategies for obtaining pharmacologically active compounds from medicinal plants: concepts about structural modification for improve the activity. **Química Nova**, v. 21, n.1, p. 99-105, jan. 1998.

CORDEIRO, M. C. R; et al. Protocolo para extração de RNA de plantas nativas do bioma cerrado e amazônico. Embrapa Cerrados, 2010, 4 p. (Embrapa Cerrados. Comunicado Técnico, 170).

COREY, E. J.; MATSUDA, S. P.; BARTEL, B. Isolation of an Arabidopsis thaliana gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 24, p. 11628-32, Dec. 1993.

CORREA FILHO, E. S. **Prospecção molecular de genes codificadores de enzimas da via de fenilpropanóides em *Dipteryx odorata* (Aubl) Willd e *Eclipta alba* (L.) Hassk.** 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

CORSINO, J. et al. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 741-748, Dec. 2000.

CORSINO, J. et al. Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 8, p. 913-916, Sept. 2003.

CRAGG, G.; NEWMAN, D. J. Drug discovery and development from natural products: the way forward. **NAPRECA Symposium Book of Proceedings**, v. 1, n. 5, p. 56-69, 2002.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1/2, p. 72-9, Aug. 2005.

DURAIPANDIYAN, V.; GNANASEKAR, M.; IGNACIMUTHU, S. Antifungal activity of triterpenoid isolated from *Azima tetracantha* leaves. **Folia Histochemica Cytobiologica**, v. 48, n. 2, p. 311-313, Jan. 2010.

EDWARDS, J. B. D. M. et al. cDNA cloning by RT-PCR. In: McPHERSON, M. J.; HAMES, B. D.; TAYLOR, G. R. **PCR a practical approach**. 2nd ed. New York: Taylor & Francis, 1995. v. 2, cap. 7, p. 111-112.

FARRELL, R. E. **RNA methodologies**: a laboratory guide for isolation and characterization. 4th ed. San Diego: Elsevier, 2010. 717 p.

FELIU, D. A. **Análise de terpenóides de espécies de Croton sect. Lamprocroton (Mull. Arg.) Pax (Euphorbiaceae)**. 2011. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GUHLING, O. et al. Cloning and characterization of a lupeol synthase involved in the synthesis of epicuticular wax crystals on stem and hypocotyl surfaces of *Ricinus communis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 448, n. 1/2, p. 60-72, Jan. 2006.

GUTIÉRREZ, F. et al. Terpenoids from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 6, p. 1049-52, June 2007.

HALL, T. A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARALAMPIDIS, K. et al. A new class of oxidosqualene cyclases directs synthesis of antimicrobial phytoprotectants in monocots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 23, p. 13431-6, June 2001.

JAKIEMI, E. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (Thymus vulgaris L.)**. 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

KUETE, V. et al. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 372-379, Aug. 2007.

LORENZI, H.; MATOS F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

MARASCHIN, M.; VERPOORT, R. Engenharia do metabolismo secundário. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.10, p. 24-28, set. 1999.

MAURY, et al. Microbial isoprenoid production: an example of green chemistry through metabolic engineering. In: NIELSEN, J. **Biotechnology for the future**. Berlin: Springer, 2005. p. 19-51.

McPHERSON, M.; MOLLER, S. Cloning genes by PCR. In: **PCR 2**. 2nd ed. New York: Taylor & Francis, 2006. p. 233-256.

MOSSI, A. J. et al. Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 339-45, May 2009.

MUNOZ, O. et al. The celastraceae from latin america chemistry and biological activity. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 18, p. 739-783, 1995.

PETRONELLI, A.; PANNITTERI, G.; TESTA, U. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. **Anti-Cancer Drugs**, v. 20, n. 10, p. 880-92, Nov. 2009.

PILLAI MANOHARAN, K. et al. Evaluation of *Polygonum bistorta* for anticancer potential using selected cancer cell lines. **Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 2 p. 121-126, Mar. 2007.

PINTO, A.; REZENDE, C. M. Um olhar holístico sobre a química de produtos naturais brasileiros. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 966-971, nov. 2003.

PRESTON, M. G. Cloning gene family members using polymerase chain reaction with degenerate oligonucleotide primers. In: RAPLEY, R. **The nucleic acid protocols**. Totowa: Humana Press, 1999. Cap. 68, p. 595-608.

PUPO, M.; GALLO, M.; VIEIRA, P. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, jan. 2007.

QUEIROGA, C. L. et al. Evaluation of the anti-ulcerogenic activity of friedelan-3-beta-ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* M. (Celastraceae). **Journal Ethnopharmacol.** v. 72, p. 465-468, Apr. 2000.

RAPLEY, R.; WILLIAMS, D. R. Agarose gel electrophoresis of nucleic acids. In: RAPLEY, R. **The nucleic acid protocols**. Totowa: Humana Press, 1999. p. 67-70.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2004. p. 403-434.

SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 650-659, abr. 2009.

SHOEB, M. Minireview anticancer agents from medicinal plants. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 1, p. 35-41, Dec. 2006.

THOLL, D.; LEE, S. Terpene specialized metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **The Arabidopsis Book/American Society of Plant**, p. 1-28, Apr. 2011.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TIEDEMANN, R. E. et al. Identification of a potent natural triterpenoid inhibitor of proteasome chymotrypsin-like activity and NF-kappaB with antimyeloma activity *in vitro* and *in vivo*. **Blood**, v. 113, n. 17, p. 4027-37, Apr. 2009.

VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 181-187, Apr. 2002.

VERPOORTE, R.; COLLIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Biochemical Review**, v. 1, n. 1, p. 13-25, July 2002.

VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; MEMELINK, J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Research**, v. 9, n. 4/5, p. 323-343, Mar. 2000.

WANG, Z. et al. Cloning and characterization of oxidosqualene cyclases from *Kalanchoe daigremontiana*: enzymes catalyzing up to 10 rearrangement steps yielding friedelin and other triterpenoids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 39, p. 29703-12, Sept. 2010.

XUE, Z. et al. Divergent evolution of oxidosqualene cyclases in plants. **The New phytologist**, v. 193, n. 4, p. 1022-38, Mar. 2012.

ANEXOS

Soluções para preparo de bactérias ultracompetentes

- TBF1 (100 mL)

KOAc	0,03 M	0,294 g
MnCl ₂	0,05 M	0,990 g
KCl	0,10 M	0,746 g
CaCl ₂	0,01 M	0,147 g
Glicerol	15 % (m/v)	15 g

Esterilizar por filtração

- TBF2 (100 mL)

MOPS pH7	0,01 M	0,204 g (ou 2 mL de estoque 0,5 M)
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,075 M	11,03 g
KCl	0,01M	0,075 g
Glicerol	15 % (m/v)	15 g

Esterilizar por autoclavação

- TYM (1000 mL)

Triptona	20 g
Extrato de levedura	5,0 g
NaCl	4,8 g
MgSO ₂ .7H ₂ O	2,5 g

Esterilizar por autoclavação

Tampão de Transformação

KCM (10X)	1,0 mL
PEG 10%	1,5 mL
Água Milli-Q autoclavada	7,5 mL

- KCM (10X)

1 M KCl
0,3 M CaCl ₂
0,5 M MgCl ₂

- PEG 10%

PEG 6000 ou 4000 m/v

Esterilizar as soluções por filtração