



Participación de las mitocondrias en la acción anti-apoptótica de una proteína aislada de la hemolinfa de *Lonomia obliqua*

Ronaldo Z. Mendonça^{1*}, Katia N. Greco¹, Helena Vieira³, Ana C.P. Pereira³, Cristina C. Peixoto³, Alvaro P.B. Souza¹, Roberto H.P. Moraes², Carlos A. Pereira¹, Manuel J.T. Carrondo³, Paula Marques³ ¹Laboratório de Imunologia Viral y ²Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, ³ Instituto de Biologia Experimental e Technologica (IBET) Oeiras, Portugal.

* Correspondence to R. Z. Mendonça Institute Butantan, Laboratory de Immunology Viral, Av. Vital Brazil 1500 CEP. 05503-900 São Paulo-Brasil, fax: (55)(11)3726.1505; e-mail: zucatelli@uol.com.br.

Palabras clave: *Lonomia obliqua*, baculovirus, hemolinfa, apoptosis, mitocondria

Introduction: Los sistemas de expresión de proteínas se utilizan intensamente para la producción de proteínas recombinantes. Sin embargo, en muchos casos, la baja cantidad de proteína obtenida ha limitado la producción industrial de algunas proteínas de interés. Por otro lado, la muerte por apoptosis también ha limitado la producción de proteínas recombinantes. Una forma de incrementar la productividad celular pudiera ser disminuyendo la muerte celular. Recientemente, demostramos la presencia de una proteína antiapoptótica potente en la hemolinfa de *Lonomia obliqua*, ya que al suplementar a cultivos celulares con la hemolinfa se aumenta la viabilidad de éstas al prevenir la apoptosis. Por otro lado, se reportó que las mitocondrias tienen una acción importante en el control del proceso de la apoptosis. La permeabilización de la membrana de las mitocondrias (MMP) puede ser un factor importante en este proceso, debido a la liberación de proteínas intermembranales al citosol (citocromo C, AIF, etc). Como un resultado de esta liberación, algunas proteínas (caspasas) y DNAsas son activadas y el proceso de muerte llega a ser irreversible. En este estudio determinamos la participación de las mitocondrias en el efecto anti-apoptótico de una proteína aislada de *Lonomia obliqua*.

Materiales y Métodos: Las células de insecto Sf-9 (*Spodoptera frugiperda*) y células HEK-293 fueron utilizadas en este estudio. El efecto de baculovirus y de los inductores químicos de la apoptosis (t-BHP y H₂O₂) en el potencial de la membrana de las mitocondrias y el anti-apoptótico de efecto de la hemolinfa se determinó por citometría de flujo (FACS) después de eliminar el marcaje de las células con DIOC6(3) y por microscopía de fluorescencia después de eliminar JC-1 y Hoechst 33342. Para la identificación de citocromo C se usó el anticuerpo monoclonal anti-citocromo C y un segundo anticuerpo (IgG) anti-ratón. La hemolinfa que se utilizó en este experimento se obtuvo de *Lonomia obliqua* (Familia Saturniidae) de la 6a fase de desarrollo. La hemolinfa se obtuvo del extravasación después de la retirada de las cerdas, se centrifugó a 1000g por 10 minutos y luego se inactivó a 60°C durante 30 minutos. La hemolinfa total (Hb) o purificada se añadió al principio del cultivo en una concentración de 1% (el v/v). Los marcadores usados para la determinación de la muerte celular por apoptosis fueron Ioduro de propídio y Hoechst 33342.

Resultados y discusión: Observamos que la adición de hemolinfa de *Lonomia obliqua* a los cultivos lleva a una prolongación de la vida celular de 3 o 4 días, permitiendo una mayor producción de proteínas recombinantes en el sistema de Baculovirus en células de insecto (Sf-9) o en

células humanas HEK-293 (Vp2, 6, 7 de Rotavirus; más de dos veces). Como control positivo de la muerte por apoptosis se usó t-BHP (500mM) o H₂O₂ (600mM). La presencia de apoptosis se evaluó por FACS, microscopía electrónica, electroforesis en gel de agarosa y por la medición del potencial electroquímico de la membrana de la mitocondria. Citocromo C se identificó en el citosol por western blot usando un anticuerpo anti-citocromo.

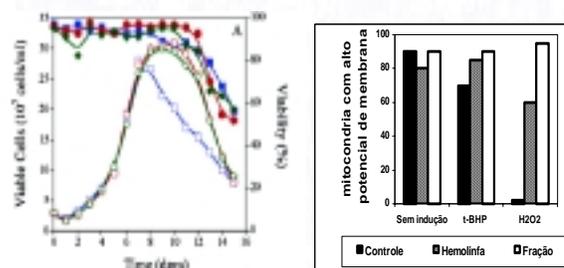


Figura 1. (A) Efecto de la hemolinfa (rojo) y su fracción (verde) en la viabilidad de las células (círculos cerrados) y número de células (círculo abiertos). Control, sin hemolinfa (lineas en azul).

(B) Efecto de la hemolinfa en el potencial de la membrana de las mitocondrias después de la inducción de apoptosis por t-BHP o H₂O₂ (B).

Conclusión: La adición de la hemolinfa a los cultivos de células animales o humanas, infectadas con Baculovirus o inductores químicos de apoptosis evitó la muerte celular por esa vía y las células tratadas con hemolinfa mantuvieron un alto potencial electroquímico en las membranas de las mitocondrias lo que sugiere que el efecto anti-apoptótico de la proteína de la hemolinfa puede tener su acción directamente en la membrana de las mitocondria, evitando la pérdida de la permeabilidad de la membrana y la liberación del Citocromo-C, permitiendo de esta forma la prolongación de la vida celular y de la producción de proteínas recombinante (Vp2,6,7 de Rota virus).

Referencias:

1. Maranga, L.; Mendonça, R.Z.; Bengala, A.; Peixoto, C.C.; Moraes, R.H.P.; Pereira, C.A.; Carrondo, M. J.T. (2003). Enhancement of Sf-9 cell growth and longevity through supplementation of culture medium with hemolymph. *Biotechnol. Prog.* (19):58-63.
2. Rhee W.J.; Park, T.H. (1999). Kinetic effect of silkworm hemolymph on the delayed host cell death in an insect cell-baculovirus system. *Biotechnol. Prog.* (15): 1028-1032.
3. Sousa, A.P.B.; Peixoto, C.C.; Maranga, L.; Carvalhal, A. V.; Moraes, R.H.P.; Mendonça, R.M.Z.; Pereira, C.A.; Carrondo, M.J.T.; Mendonça, R.Z. (2005). Purification and characterization of an anti-apoptotic protein isolated from *Lonomia obliqua* hemolymph. *Biotechnol. Prog.* (21):99-105.

Agradecimiento: FAPESP:03/08728-1; 00/09800-Grices