

EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS RECOMBINANTES DE *HERMETIA ILLUCENS* COMO ALTERNATIVA A PROMOTORES DE CRESCIMENTO NA AVICULTURA

NATÁLIA KOMMLING VILELA¹; RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES²; FLÁVIA ROCHA MEDEIROS³; MARIANA BARROS DEUNER⁴; CRISTIAN HENRIQUE SOTT⁵; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – nataliakvilela@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rafaelr458@gmail.com

³Universidade Federal de pelotas – rochamedeirosflavia@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – marianabarros135@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – cristian.sott@ufpel.edu.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A avicultura de corte representa um setor de grande crescimento e relevância econômica global, impulsionado pela alta demanda de consumo. Por décadas, a produção intensiva utilizou antibióticos como promotores de crescimento para garantir a saúde das aves e a produtividade. No entanto, o uso indiscriminado desses compostos acelerou o desenvolvimento de resistência antimicrobiana, um grave problema de saúde pública mundial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). A restrição ao uso de antibióticos, embora necessária, levou ao aumento da incidência de doenças entéricas, como a enterite necrótica causada por *Clostridium perfringens*, gerando perdas econômicas significativas e evidenciando a necessidade urgente de alternativas eficazes e sustentáveis (MOORE, 2023).

Nesse cenário, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) surgem como uma alternativa promissora. Produzidos naturalmente por diversos organismos, como os insetos, os PAMs possuem atividade de amplo espectro contra patógenos e baixa propensão a induzir resistência (WANG et al., 2016). A mosca soldado negro (*Hermetia illucens*) é uma fonte rica desses peptídeos, contudo, a aplicação prática e a produção em larga escala a partir da extração direta do inseto são dificultadas por desafios como o alto custo de purificação, a instabilidade dos peptídeos devido à degradação por proteases e potenciais questões de segurança, como reações alérgicas e contaminação (XIA, 2021).

A tecnologia do DNA recombinante, utilizando sistemas de expressão heteróloga como a bactéria *Escherichia coli*, oferece uma plataforma eficiente para a produção de PAMs em grande quantidade e com alto grau de pureza, superando os desafios da extração direta do inseto (XU et al., 2020). Contudo, a produção de PAMs em *E. coli* enfrenta desafios como a baixa solubilidade e a limitada expressão. A baixa solubilidade está frequentemente associada ao enovelamento incorreto da proteína recombinante, o que favorece a formação de agregados conhecidos como corpos de inclusão. Nessas condições, os peptídeos deixam de adquirir a conformação nativa necessária para a sua estabilidade e atividade biológica, comprometendo não apenas a recuperação do produto funcional, mas também aumentando os custos e a complexidade do processo de purificação. Trabalhos como o de ELHAG (2017) demonstraram que a fusão com tioredoxina (Trx) foi crucial para aumentar a quantidade e a solubilidade de PAMs de insetos, facilitando sua purificação e análise funcional.

Para superar os desafios inerentes à produção de PAMs recombinantes, estratégias recorrentes incluem a fusão de peptídeos a tags de solubilidade e o uso de mutações pontuais. Entre estas, destaca-se a Trx, uma proteína de fusão de aproximadamente 12 kDa, reconhecida pela sua eficácia em

aumentar a expressão solúvel e melhorar o rendimento final do produto (ZHANG, 2022). Além disso, com o objetivo de otimizar a produção e funcionalidade de PAMs recombinantes, mutações pontuais podem ser introduzidas na sua sequência. Estas modificações permitem, por exemplo, reduzir a suscetibilidade à degradação por proteases endógenas, aumentar a estabilidade estrutural e até potencializar a sua atividade biológica, ampliando assim as possibilidades de aplicação na substituição de antibióticos promotores de crescimento (CHEN, 2017).

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo abordar o processo de expressão em *E. coli*, purificação e caracterização de dois peptídeos de *Hermetia illucens* e suas versões mutadas correspondentes fusionadas à Trx.

2. METODOLOGIA

2.1 Expressão em *E. coli*:

Os genes sintéticos codificantes para os peptídeos defensina e hifensina de *H. illucens* e suas respectivas versões mutadas foram previamente clonados no vetor pET-28a. O plasmídeo recombinante foi inserido na bactéria *Escherichia coli* BL21(DE3) via choque térmico, conforme descrito por SAMBROOK (2012). As bactérias transformadas foram cultivadas em *erlenmeyers* contendo 50 mL de meio Luria Bertani (LB), suplementado com canamicina (50 µg/mL), os quais foram incubados por 24 horas na temperatura de 37 °C em agitador orbital a 180 RPM (rotações por minuto).

Após esse período, os pré-inóculos foram inoculados em *erlenmeyers* de 2 litros, contendo 500 mL de meio LB, suplementado com canamicina (50 µg/mL), e submetido às mesmas condições descritas anteriormente. A densidade óptica (DO) a 600 nm dos cultivos foi acompanhada, até que as células atingissem a fase log de crescimento, em torno de ~0.8. A expressão gênica foi induzida pela adição de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a uma concentração final de 1 mM. A cultura induzida foi mantida sob agitação a 37 °C durante 3 horas e amostras foram coletadas antes e após a indução para análise em gel de poli-acrilamida (SDS-PAGE) e *Western blot*.

Para a recuperação dos peptídeos, os cultivos foram centrifugados (10.000 RPM por 10 minutos), e após descarte dos sobrenadantes, os pellets foram ressuspensos com a adição de 45 mL de Tampão *Wash* (NaH₂PO₄ 20mM, NaCl 500mM, Imidazol 10mM), acrescidos de 45 µL de lisozima para ajudar na lise. Após, foram incubados por 1 hora a 37°C em um shaker sob agitação de 180 RPM, levados para o processo de sonicação e centrifugados novamente (10.000 RPM por 10 minutos), para a coleta do sobrenadante da lise de cada um dos peptídeos, os quais foram armazenados a -20°C para análises posteriores. Por fim, aos pellets que permaneceram, foi adicionado Tampão *Wash* (NaH₂PO₄ 20mM, NaCl 500mM, Imidazol 10mM, ureia 8M) e armazenados overnight a 4°C sob agitação para desfazer os pellets. No outro dia, foram centrifugados novamente (10.000 RPM por 10 minutos) e enfim, foram coletados também as frações correspondentes ao sobrenadante da ureia.

2.2 Purificação dos peptídeos recombinantes:

O processo de purificação foi realizado por cromatografia de afinidade em coluna HisTrap FF e HP, baseado na afinidade da cauda de poli-histidina (His-tag), fusionada ao peptídeo, pelo níquel, imobilizado na matriz da coluna. As frações purificadas correspondentes ao sobrenadante da lise foram analisadas por SDS-PAGE e a concentração de proteína foi determinada pelo método de BCA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão dos peptídeos recombinantes defensina (10.5 kDa) e hidefensina (9 kDa) e suas versões mutadas foi confirmada por SDS-PAGE. Conforme observado na Figura 1, após a indução com IPTG, foram visualizadas bandas proeminentes com massa molecular entre 15 e 22 kDa para as quatro versões dos AMPs, o que corresponde ao tamanho esperado para as construções fusionadas à tag de Tiorredoxina (Trx, ~12 kDa). Bandas adicionais de maior peso molecular detectadas pelo anticorpo anti-His provavelmente representam formas oligoméricas ou agregadas da proteína recombinante.

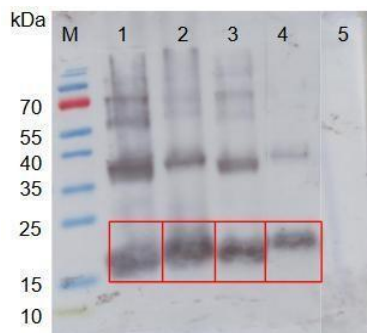


Figura 1. Expressão de quatro peptídeos recombinantes fusionados à tiorredoxina. Western Blot mostrando o extrato total de *E. coli* após indução. M, Marcador de peso molecular; 1, Defensina Mutada; 2, Defensina; 3, Hidefensina Mutada; 4, Hidefensina; 5, Controle negativo (vetor vazio).

Para avaliar o perfil de solubilidade e a eficácia da tag Trx, o lisado celular de cada cultura foi fracionado em componentes solúvel e insolúvel. A análise por SDS-PAGE (Figura 2) revelou que, para todos os peptídeos, a banda de interesse foi detectada tanto na fração solúvel (sobrenadante da lise) quanto na insolúvel (recuperada com ureia). Este resultado indica que as proteínas apresentaram solubilidade parcial. Embora parte das construções tenha formado corpos de inclusão, a estratégia de fusão com a tag Trx foi bem sucedida em manter uma quantidade substancial da proteína em sua forma solúvel, viabilizando a purificação subsequente a partir desta fração.

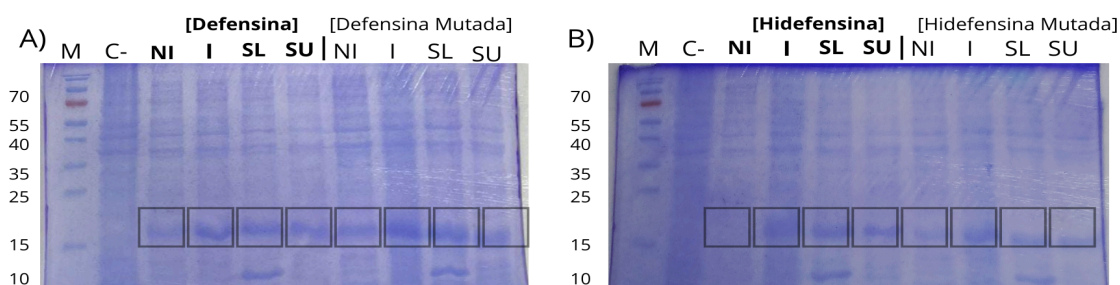


Figura 2. Análise de solubilidade dos peptídeos recombinantes. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) corado com Coomassie Blue. (A) Análise da Defensina e Defensina Mutada. (B) Análise da Hidefensina e Hidefensina Mutada. Em ambos os painéis: M, Marcador de peso molecular; NI, amostra não induzida; I, amostra total induzida; SL, sobrenadante da lise (fração solúvel); SU, sobrenadante da ureia (fração insolúvel).

A partir da fração solúvel, os peptídeos foram purificados com sucesso por cromatografia de afinidade, como demonstrado na Figura 3. A análise em SDS-PAGE das frações eluídas confirmou a obtenção dos peptídeos purificados.

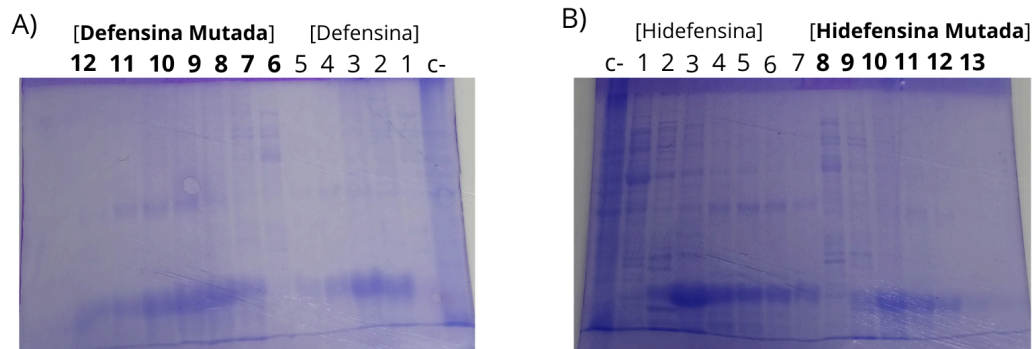


Figura 3. Análise da purificação dos peptídeos recombinantes. Observam-se as diferentes frações eluídas no processo de purificação pelo equipamento ÄKATA de cada um dos peptídeos expressos: A) Defensina (1 - 5); Defensina Mutada (6 - 12); B) Hidefensina (1 - 7); Hidefensina Mutada (8 - 13). As amostras das eluições foram escolhidas com base nos gráficos dos picos de concentração geradas pelo equipamento, fazendo-se assim a verificação da informação através do SDS-PAGE.

4. CONCLUSÕES

A expressão dos peptídeos recombinantes de *H. illucens* em *Escherichia coli* mostrou-se eficiente, permitindo a obtenção de níveis satisfatórios de expressão e solubilidade. Os PAMs foram purificados com sucesso. Futuramente, pretende-se avaliar sua atividade antimicrobiana *in vitro* e empregá-los em formulações para testes em aves, visando desenvolver alternativas sustentáveis aos antibióticos convencionais, com potencial aplicação na produção animal e redução do uso de fármacos antimicrobianos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- World Health Organization. (2014). WHO's First Global Report on Antibiotic Resistance Reveals Serious, Worldwide Threat to Public Health. Available online at: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>
- MOORE, R. J. Necrotic enteritis and antibiotic-free production of broiler chickens: Challenges in testing and using alternative products. **Animal nutrition**, v. 16, p. 288–298, 1 mar. 2024.
- WANG, S. et al. Antimicrobial Peptides as Potential Alternatives to Antibiotics in Food Animal Industry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 603, 3 maio 2016.
- XIA, J.; GE, C.; YAO, H. Antimicrobial Peptides from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as Potential Antimicrobial Factors Representing an Alternative to Antibiotics in Livestock Farming. **Animals**, v. 11, n. 7, p. 1937, 29 jun. 2021.
- XU, J. et al. Transgenic expression of antimicrobial peptides from black soldier fly enhance resistance against entomopathogenic bacteria in the silkworm, *Bombyx mori*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, p. 103487–103487, 1 dez. 2020.
- ZHANG, J. et al. Structural and functional characterizations and heterogenous expression of the antimicrobial peptides, Hidefensins, from black soldier fly, *Hermetia illucens* (L.). **Protein Expression and Purification**, v. 192, p. 106032, abr. 2022.
- ELHAG, O. et al. Screening, Expression, Purification and Functional Characterization of Novel Antimicrobial Peptide Genes from *Hermetia illucens* (L.). **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169582, 5 jan. 2017.
- CHEN, H. et al. Design and pharmacodynamics of recombinant NZ2114 histidine mutants with improved activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **AMB Express**, v. 7, n. 1, 22 fev. 2017.
- GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. V. 1. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.