



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE

UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE

CURSO BACHARELADO EM FARMÁCIA

JOICY RAÍSSA PONTES CIPRIANO

**ESTUDO DA TOXICIDADE DO EXTRATO DA PROTEÍNA
PAOLP RECOMBINANTE**

CUITÉ – PB

2025

JOICY RAÍSSA PONTES CIPRIANO

**ESTUDO DA TOXICIDADE DO EXTRATO DA PROTEÍNA
PAOLP RECOMBINANTE**

Projeto de TCC apresentado à Coordenação do Curso de Bacharelado em Farmácia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande – Campus Cuité, como requisito obrigatório da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Magnólia de Araújo Campos

Co-orientador: Me. Diogo Leonardo Santos Silva

CUITÉ – PB

2025

C577e Cipriano, Joicy Raíssa Pontes.

Estudo da toxicidade do extrato da proteína PaOLP recombinante. / Joicy Raíssa Pontes Cipriano. - Cuité, 2025.

38 f.: il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, 2025.

"Orientação: Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos; Prof. Me. Diogo Leonardo Santos Silva".

Referências.

1. Obesidade. 2. *Allium cepa*. 3. Adiponectina. 4. Proteína osmotina. 5. Proteína PaOLP – extrato - toxicidade. 6. Centro de Educação e Saúde. I. Campos, Magnólia de Araújo. II. Silva, Diogo Leonardo Santos. III. Título.

CDU 616.39(043)

JOICY RAÍSSA PONTES CIPRIANO

**ESTUDO DA TOXICIDADE DO EXTRATO DA PROTEÍNA
PAOLP RECOMBINANTE**

Aprovada em: 29 de Abril de 2025

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **MAGNOLIA DE ARAUJO CAMPOS PFENNING**
Data: 16/05/2025 22:22:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos

Orientadora

Prof. Dr. Rafael Trindade Maia

Examinador Interno

Documento assinado digitalmente
 **CAMILA FRANCO BATISTA DE OLIVEIRA**
Data: 17/05/2025 06:58:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra Camila Franco Batista de Oliveira

Examinadora externa

Cuité - PB

2025

AGRADECIMENTOS

A meu Deus, por me permitir viver suas promessas e por ser meu fiel companheiro todos os dias.

A Universidade Federal de Campina Grande - CES, por realizar o sonho de tantos estudantes, inclusive o meu.

A minha orientadora e amiga, Prof. Dra. Magnólia de Araújo Campos, por todos os ensinamentos e pela confiança depositada. Suas características a tornam única e especial, a guardo no meu coração com muita gratidão, admiração e carinho.

A meu co-orientador, Me. Diogo Leonardo Santos Silva, pela sua contribuição neste trabalho e também na minha vida acadêmica.

Aos queridos, Prof. Dra Camila Franco Batista de Oliveira e ao Prof. Dr. Rafael Trindade Maia, pela disponibilidade em integrar a banca examinadora.

A minha família, por me incentivar a seguir em frente, mas sempre me lembrando que nunca estou sozinha.

Aos amigos que construí durante essa caminhada, vocês tornaram tudo mais leve, pois quando tudo parecia difícil, a solução sempre era um super jantar.

Aos integrantes do LBIOTEC, pelo apoio e companheirismo.

Muito obrigada!

RESUMO

A obesidade é um problema de saúde pública mundial associada a diversos tipos de doenças e alterações, como reduções nos níveis de adiponectina. Pesquisas apontam a proteína osmotina como agonista do hormônio adiponectina. Isto levou ao isolamento de um gene que codifica para uma proteína do tipo osmotina, denominado de *PaOLP*, o qual foi clonado em vetor pQE30 para produzir a proteína madura recombinante, PaOLPHis6, em células de *E. coli* M15. Visando complementar os estudos para potencial aplicação biotecnológica, neste trabalho estudou-se a toxicidade da fração solúvel da proteína PaOLPHis6 em raízes de *Allium cepa*. A concentração de proteínas totais presentes nos extratos a partir de células contendo ou não o gene para PaOLPHis6 (células M15 PaOLP e M15), com expressão induzida e não induzida, foi determinada por espectrofotometria. As raízes foram tratadas com os extratos de M15 PaOLP induzido e não induzido, M15 induzido e não induzido, além do controle negativo e positivo, durante 72 horas. A análise da toxicidade foi feita a partir de cortes nas raízes estudadas e produção de lâminas que foram observadas em microscópio óptico. Um total de 300 células por lâmina foi contabilizado, registrando-se o número de células em mitose. A análise dos dados indicou que os tratamentos com os extratos não afetaram o crescimento das raízes, bem como, a divisão celular. A presença de alterações cromossômicas e nucleares não foi observada, exceto no grupo controle positivo. Portanto, os dados dessa pesquisa não sugerem toxicidade aos extratos, e isso representa uma informação relevante. Futuros testes *in vitro*, em culturas de células de animais, e *in vivo*, em camundongos testes *in vitro* contribuirão para a validação da atividade e toxicidade de PaOLP.

Palavras-chave: Osmotina, *Allium cepa*, expressão heteróloga de proteínas.

ABSTRACT

Obesity is a global public health problem associated with several types of diseases and alterations, such as reductions in adiponectin levels. Research indicates that the protein osmotin is an agonist of the adiponectin hormone. This led to the isolation of a gene that encodes an osmotin-like protein, called *PaOLP*, which was cloned into the pQE30 vector to produce the recombinant mature protein, PaOLPHis6, in *E. coli* M15 cells. Aiming to complement the studies for potential biotechnological application, this work studied the toxicity of the soluble fraction of the PaOLPHis6 protein in *Allium cepa* roots. The concentration of total proteins present in the extracts from cells containing or not the gene for PaOLPHis6 (M15 PaOLP and M15 cells), with induced and non-induced expression, was determined by spectrophotometry. The roots were treated with extracts of induced and non-induced M15 PaOLP, induced and non-induced M15, and negative and positive controls for 72 hours. Toxicity analysis was performed by cutting the roots and producing slides that were observed under a common optical microscope. A total of 300 cells per slide were counted, and the number of cells in mitosis was recorded. Data analysis indicated that treatments with the extracts did not affect root growth or cell division. The presence of chromosomal and nuclear alterations was not observed, except in the positive control group. Therefore, the data from this study do not suggest toxicity to the extracts, and this represents relevant information. Future *in vitro*, such as in animal cell cultures, and *in vivo* tests, such as in mice, will contribute to the validation of PaOLP activity and toxicity.

Keywords: Osmotin, *Allium cepa*, heterologous protein expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura e receptores da adiponectina.	15
Figura 2. Cultivo bacteriano.	19
Figura 3. Extratos proteicos obtidos.	20
Figura 4. Quantificação por espectrofotometria.	21
Figura 5. Germinação das cebolas.	22
Figura 6. Grupos recebendo os tratamentos.	23
Figura 7. Raízes coradas para análise microscópica.	24
Figura 8. Concentração de proteínas totais nos extratos.	26
Figura 9. Efeito dos tratamentos sobre o crescimento de raízes de <i>A. cepa</i> , em 24 h.	27
Figura 10. Efeito dos tratamentos sobre o crescimento de raízes de <i>A. cepa</i> , em 48 h.	28
Figura 11. Efeito dos tratamentos sobre o crescimento de raízes de <i>A. cepa</i> , em 72 h.	29
Figura 12A e 12B: Fases da divisão celular	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Número de células de raízes de <i>A. cepa</i> em diferentes fases do ciclo celular, em 72 h de tratamento.	31
Tabela 2. Índice mitótico em raízes de <i>A. cepa</i> , em 72 h de tratamento.	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AdipoRs	Receptores de adiponectina
CES	Centro de Educação e Saúde
CuSO ₄	Sulfato de cobre
IL-6	Interleucina 6
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa	Quilodalton
NK	Natural Killer
PaOLP	<i>Physalis angulata</i> “ Osmotin-Like Protein ”
PR-5	Proteínas relacionadas à patogênese
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
3.1 Adiponectina e obesidade	13
3.2 Adiponectina e receptores de adiponectina	14
3.3 Osmotina como homólogo da adiponectina	15
3.4 Proteínas do tipo osmotina de plantas: PaOLP	16
3.5 Uso de bioensaios para avaliação de toxicidade de compostos	17
4 METODOLOGIA	18
4.1 Indução da expressão em <i>E. coli</i> e obtenção de extrato da proteína PaOLP madura recombinante	18
4.2 Bioensaio de toxicidade em sistemas de raízes de <i>Allium cepa</i>	21
4.3 Análise estatística dos dados	25
4.4 Predição <i>in silico</i> da toxicidade metabólica da proteína PaOLP	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Concentração de proteínas totais	26
5.2 Dados obtidos pelo bioensaio em <i>A. cepa</i>	26
5.2.1 Análise da influência dos tratamentos nos crescimento das raízes	26
5.2.2 Análise da influência dos tratamentos no ciclo celular	30
5.3 Resultados da predição da toxicidade da proteína PaOLP	32
6. CONCLUSÃO	32
7 REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O excesso de peso representa um grave problema de saúde pública mundial que afeta cerca de 2 bilhões de pessoas. Vários fatores contribuem para a alta incidência de sobrepeso e obesidade, especialmente em países de alta renda, onde o poder aquisitivo, a alimentação rica em gorduras e o sedentarismo são mais prevalentes. Esta condição está relacionada a diversas doenças, como diabetes mellitus tipo 2, doença hepática gordurosa não alcoólica, doença cardiovascular e câncer (Zhang *et al.*, 2023).

A adiponectina é um hormônio secretado principalmente pelos adipócitos do tecido adiposo branco, que ao interagir com seus receptores AdipoR1, AdipoR2 e T-caderina, por meio de interações ligante-receptor, promove efeitos antidiabéticos, antioxidantes, anti-inflamatórios e antiateroscleróticos. No entanto, baixos níveis de adiponectina são observados em pacientes diagnosticados com obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (Choi, Doss e Kim, 2020).

Aisike e colaboradores (2023) demonstram que não houveram diferenças significativas nos níveis de adiponectina e leptina entre indivíduos com obesidade metabolicamente saudável e não saudável, portanto, estas adipocinas demonstraram associação a parâmetros metabólicos em pessoas obesas. Os autores enfatizam ainda que a diminuição da adiponectina e/ou o aumento da leptina podem contribuir para distúrbios metabólicos relacionados à obesidade.

A proteína osmotina demonstrou capacidade terapêutica em distúrbios metabólicos como a obesidade, no qual induziu vias de sinalização e efeito semelhante a adiponectina em ensaios *in silico* (Ahmad *et al.*, 2019) e *in vivo* (Jo *et al.*, 2019).

A busca por ligantes dos receptores de adiponectina levou a descoberta de que a proteína osmotina de fumo (*Nicotiana tabacum*), membro da subclasse 5 de proteínas relacionadas à patogênese (PR-5), atua como agonista do hormônio adiponectina humana (Kadowaki, Yamauchi, 2005; Miele, Constantini e Colonna, 2011).

Desse modo, Abreu e colaboradores (2012) isolaram um gene que codifica para uma proteína do tipo osmotina, a partir do genoma da planta *Physalis angulata*, presente no Horto Florestal do Centro de Educação e Saúde campus da UFCG, e denominaram de PaOLP.

Batista (2015), realizou uma análise estrutural e funcional comparativa por bioinformática e propôs um modelo 3D estável para PaOLP, com representação muito próxima da estrutura real da proteína e sítio ativo com características funcionais características para a família PR-5 do tipo osmotina. Além disso, PaOLP se ligou fortemente ao receptor de adiponectina com interação comprovada por energias eletrostáticas.

Visando a realização de estudos para validação funcional *in vitro*, o gene PaOLP foi clonado para expressão heteróloga em *Escherichia coli* como proteína PaOLP madura recombinante (Batista, 2018).

Desse modo, a pesquisa proposta neste projeto dá continuidade a trabalhos anteriores desenvolvidos por Batista (2015; 2018), os quais indicaram a PaOLP como possível candidato a fármaco, no qual o ensaio de toxicidade em raízes de *Allium cepa* contribuirá para o direcionamento de estudos no interesse de aplicação biotecnológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do extrato proteico de *Escherichia coli* induzida e não induzida para expressão da proteína PaOLP recombinante, em ensaio de raízes de *Allium cepa*, como forma de verificar a toxicidade da proteína.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar bioensaio para a expressão heteróloga da proteína PaOLP recombinante, induzida em células de *Escherichia coli* M15[pREP4] contendo a construção pQE30-PaOLPHis6;
- Obter o extrato da fração solúvel contendo proteína PaOLP recombinante, expressa em células de *Escherichia coli* M15;
- Realizar bioensaios *in vitro* em sistema de raízes de *Allium cepa*, usando o do extrato da proteína PaOLP recombinante e analisar a existência de possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos;
- Realizar a predição de toxicidade da proteína PaOLP para avaliação *in silico*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Adiponectina e obesidade

A obesidade é uma doença crônica complexa, caracterizada pelo excesso de gordura corporal. Sua origem é de caráter multifatorial e está relacionada a fatores ambientais, psicossociais e genéticos, sendo considerada como uma epidemia mundial que, até 2030, atingirá mais de um bilhão de adultos (OMS, 2023).

Durante muitos anos, o tecido adiposo era relacionado apenas como um reservatório energético, no entanto, com o passar das décadas, pesquisas o apontaram como um órgão endócrino ativo, responsável pela secreção de adipocinas, citocinas, metabólitos e exossomos, dentre eles, a adiponectina (Zhao, Kusminski e Scherer, 2021).

A adiponectina é uma proteína sensibilizadora de insulina, codificada pelo gene *ADIPOQ* e com o peso molecular de 30 kDa. Ela está envolvida na modulação de diversas doenças metabólicas como diabetes, dislipidemia, aterosclerose e disfunção metabólica comórbida que ocorrem em doenças cardiovasculares, como hipertensão. No entanto, os níveis de adiponectina diminuem em pacientes obesos (Kim *et al.*, 2020; Pinho, Paiva e Oliveira, 2022).

Logo, a supernutrição com alimentos hipercalóricos ocasionam a hipertrofia do tecido adiposo branco abdominal e subcutâneo, resultando em hipóxia e consequente interrupção da síntese de adiponectina. O quadro de hipertrofia dos adipócitos irá desencadear uma série de disfunções como resistência à insulina, inflamação crônica, infiltração de macrófagos no tecido adiposo, disfunção mitocondrial e, por fim, morte dos adipócitos (Kalkman, 2021).

A diminuição nos níveis de adiponectina associada ao aumento da concentração de leptina, bem como a elevação de macrófagos e outras células do sistema imune, como TNF- α , IL-6 e citocinas, promovem a infiltração no tecido adiposo, relacionando a obesidade com o processo inflamatório e a resistência à insulina (Pant *et al.*, 2021).

A desregulação de adipocitocinas como adiponectina, são fatores importantes para desenvolvimento de obesidade e distúrbios metabólicos relacionados, uma vez que, em concentrações normais, ela atua melhorando o metabolismo da glicose e dos lipídios, aumentando a sensibilidade à insulina, reduzindo o estresse oxidativo e a inflamação e estimulando a vascularização do tecido adiposo (Han *et al.*, 2024).

Ele *et al.* (2024) descrevem que a obesidade abdominal está relacionada com o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo II, destacando a adiponectina circulante como mediadora nesse processo, no qual, os baixos níveis podem representar o risco de diabetes induzido pela obesidade.

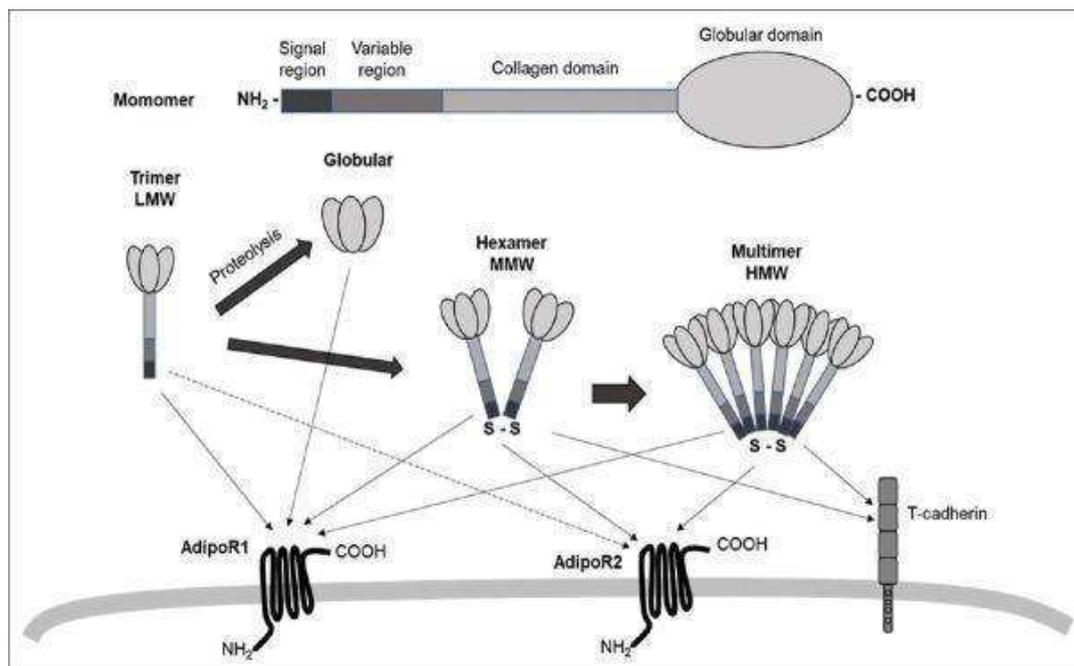
Liu e colaboradores (2022) relatam que a obesidade é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Nesse sentido, os autores destacam a adiponectina como uma adipocina do tipo protetora em doenças metabólicas, como a aterosclerose, podendo reduzir os níveis da lipoproteína de baixa densidade e aumentar a lipoproteína de alta densidade, oferecendo proteção contra a aterosclerose.

3.2 Adiponectina e receptores de adiponectina

Também nomeada como ApN, ACRP30, AdipoQ, apM1 ou GBP28, a adiponectina circula no plasma nas isoformas de monômero, trímeros (LMW), hexâmeros (MMW) e multímeros (HMW), os quais interagem com os receptores AdipoR1, AdipoR2 e T-caderina, como representa a figura 1 (Nguyen, 2020).

Os receptores AdipoRs estão presentes na maioria dos tecidos e células imunes como monócitos, células B e células NK. O AdipoR1 apresenta maior expressão no músculo esquelético, já o AdipoR2 é expresso principalmente no fígado, enquanto a T-caderina é altamente expressa em células endoteliais vasculares e musculares lisas lesionadas (Ramakrishnan *et al.*, 2024).

Figura 1. Estrutura e receptores da adiponectina.



Fonte: Nguyen, 2020.

3.3 Osmotina como homólogo da adiponectina

A osmotina é uma proteína multifuncional com um peso molecular de 24 kDa, que responde às condições de estresse, como alta salinidade, variações de temperatura e déficit hídrico, oferecendo osmotolerância para a planta (Abdin, Kiran e Alam, 2011).

Isolada pela primeira vez em células de tabaco, a osmotina foi relacionada a diversas funções biológicas, incluindo a osmorregulação, papel no sistema imunológico das plantas e atividade antifúngica. Posteriormente, estudos levaram à descoberta de que a proteína osmotina de fumo (*Nicotiana tabacum*) atua como homóloga da adiponectina humana (Viktorova *et al*, 2019).

Além de ser investigada como uma competidora natural dos receptores de adiponectina, a osmotina de fumo participa de processos patológicos, como apoptose celular e resposta inflamatória, além de apresentar efeitos protetores contra diversos distúrbios por meio da modulação dos AdipoRs (Liu *et al.*, 2017).

Sua estrutura é constituída por 246 aminoácidos, e possui um peptídeo sinal de 21 aminoácidos, sem semelhança de sequência com a adiponectina humana, que contém 244

aminoácidos (Takahashi *et al.*, 2018). Logo, a osmotina apresenta potencial para uso como fármaco voltado ao tratamento da obesidade, aterosclerose e resistência à insulina (Viktorova *et al.*, 2019).

3.4 Proteínas do tipo osmotina de plantas: PaOLP

As plantas estão constantemente sujeitas a exposição à estresses bióticos e abióticos, estes desencadeiam uma série de cascatas que ativam sinais de defesa intracelular, resultando na produção de antimicrobianos e proteínas relacionadas à patogênese (PR), as quais atuam como ferramentas de defesa (Kumar *et al.*, 2015).

As proteínas do tipo osmotina (OLPs) são membros da subclasse PR-5 e apresentam propriedades antifúngicas e papéis cruciais na fisiologia e desenvolvimento das plantas. Ademais, pesquisas apontaram a osmotina como homóloga do hormônio adiponectina, devido à semelhança funcional entre elas (Bashir *et al.*, 2020).

Nesse contexto, foi isolado no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Educação e Saúde, um gene que codifica para uma proteína do tipo osmotina, denominada PaOLP (de *Physalis angulata* “Osmotin-Like Protein”), a partir do genoma da planta *Physalis angulata* (Abreu *et al.*, 2012).

Abreu e colaboradores (2012) relatam ainda que PaOLP madura possui 16 resíduos de cisteína conservadas que estão envolvidos em oito pontes dissulfeto, características das proteínas do tipo PR-5. Além disso, os autores observaram similaridades de sequência dos aminoácidos de PaOLP com proteínas antifúngicas do tipo PR-5, disponíveis no Banco de dados GenBank, variando de 62 a 97%.

Com base na análise estrutural e funcional comparativa por bioinformática, um modelo 3D estável foi proposto para PaOLP, com representação muito próxima da estrutura real da proteína, apresentando sítio ativo com características funcionais típicas para a família de proteínas PR-5 do tipo osmotina. Ademais, PaOLP se ligou fortemente ao receptor de adiponectina com interação comprovada por energias eletrostáticas (Batista, 2015).

Desse modo, estes estudos apontaram que PaOLP representa um promissor candidato terapêutico para ser explorado como agonista alternativo para a adiponectina, que está disponível e livre de propriedade intelectual.

3.5 Uso de bioensaios para avaliação de toxicidade de compostos

Os estudos pré-clínicos desempenham um papel no processo de desenvolvimento de novos fármacos e são conduzidos para avaliar possíveis efeitos adversos e riscos à saúde humana, sendo classificados em três categorias: farmacológicos, farmacocinéticos e toxicológicos (Lavandeira, 2014).

Entre os testes para avaliação da toxicidade de compostos, destacam-se os bioensaios utilizando vegetais, pois são testes sensíveis, simples, de baixo custo e eficientes. A utilização de sistemas de raízes de *Allium cepa* são frequentes, devido sua alta correlação dos resultados com outros tipos de bioensaios (Krüger, 2009), grande tamanho de genoma (>15000 Mbp) e baixo número de cromossomos ($2n=16$), o que possibilita a análise de parâmetros como índice mitótico, micronúcleos e aberrações cromossômicas (Alias *et al.*, 2023).

Diante disso, os bioensaios utilizando *A. cepa* são uma excelente alternativa para avaliação de toxicidade de compostos.

4 METODOLOGIA

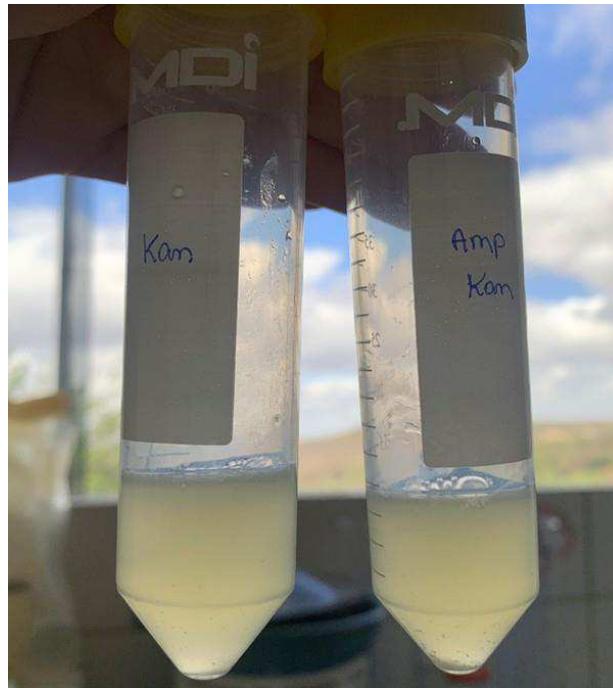
O presente estudo trata-se de uma pesquisa experimental, baseada na análise da toxicidade do extrato da proteína PaOLP recombinante, avaliando possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos através de bioensaios utilizando raízes de *Allium cepa*.

4.1 Indução da expressão em *E. coli* e obtenção de extrato da proteína PaOLP madura recombinante

O gene da proteína PaOLP madura recombinante encontra-se clonado em cepa de *Escherichia coli*, mantida a -20°C, e disponível no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande (CES-UFCG), clonagem realizada em trabalho anterior.

A expressão da proteína PaOLP madura recombinante foi realizada de acordo com as instruções do Kit *The QIA Expressionist* do vetor pQE30 (Qiagen). Os níveis de expressão da proteína madura foram obtidos a partir de células de um clone de *E. coli* M15 [pREP4] contendo a construção pQE30-PaOLPHis6, sob condições de cultivo determinadas por Batista (2018), representados na figura 2.

Figura 2. Cultivo bacteriano.



Fonte: Dados da pesquisa.

A indução da expressão da proteína PaOLP madura recombinante se deu pela adição de IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo). No qual, uma alíquota de células foi coletada e reservada como controle não induzido, enquanto que alíquotas de células induzidas foi coletada após a indução. A alíquota da fração solúvel da proteína recombinante foi reservada a partir do sobrenadante.

Ademais, também foi realizada a indução da expressão da *E. coli M15* controle (apenas com o vetor pQE30). Desse modo, os extratos proteicos foram obtidos conforme orientação do Kit e reservados para teste posterior, como representa a figura 3.

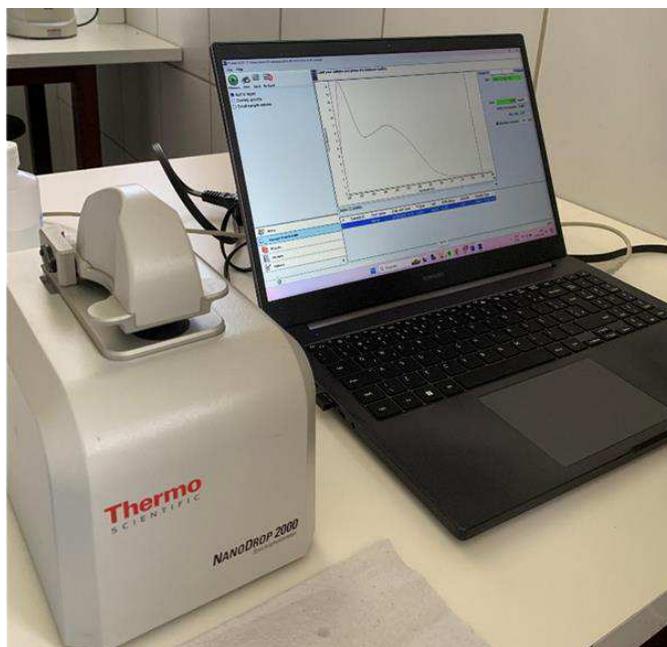
Figura 3. Extratos proteicos obtidos.



Fonte: Dados da pesquisa.

A concentração de proteínas totais presentes nos extratos foi determinada por meio de espectrofotometria, utilizando o Nanodrop 2000, como demonstra a figura 4.

Figura 4. Quantificação por espectrofotometria.



Fonte: Dados da pesquisa.

4.2 Bioensaio de toxicidade em sistemas de raízes de *Allium cepa*

O bioensaio utilizando o sistema de raízes de *Allium cepa* foi realizado por meio de adaptações do protocolo relatado por Nefic e colaboradores (2013). Para tal, 100 cebolas, adquiridas comercialmente no município de Cuité-PB, tiveram a região radicular imersa em água destilada durante 48 horas (Figura 5).

Figura 5. Germinação das cebolas.



Fonte: Dados da pesquisa.

Por conseguinte, foram selecionadas as cebolas que obtiveram o melhor crescimento e estas foram separadas em grupos (figura 6), os quais receberam os tratamentos com os extratos PaOLP induzido, PaOLP não induzido, M15 induzido e M15 não induzido. Além disso, foram estabelecidos os grupos para controle positivo (CP), utilizando CuSO_4 e controle negativo (CN), utilizando água destilada.

Figura 6. Grupos recebendo os tratamentos.



Fonte: Dados da pesquisa.

Após 72h de tratamento, as raízes foram coletadas e direcionadas ao preparo das lâminas. Para tal, as raízes foram embebidas em solução de Carnoy, durante 24h, a 4°C. Posteriormente, as raízes foram lavadas em água destilada e embebidas em solução de hidrólise ácida, em banho Maria a 60° C, durante 10 minutos. As amostras foram lavadas em água destilada e embebidas em Reativo de Schiff, durante 2 horas (figura 7).

Figura 7. Raízes coradas para análise microscópica.



Fonte: Dados da pesquisa.

Consecutivamente, as raízes foram lavadas em água sulfurosa para remoção do excesso do corante, permitindo melhor visualização do material ao ser levado ao microscópio. Em seguida, as raízes foram colocadas em lâminas de microscopia, a coifa foi removida e a região meristemática foi macerada, exposta ao Carmim e coberta com a lamínula (Nefic, 2013).

Diante disto, as lâminas foram observadas em microscópio óptico, utilizando a objetiva de 40x. Foram contabilizadas 300 células por lâmina, totalizando 1.800 células por grupo e registrados o número de células em mitose.

O Índice Mitótico foi calculado por meio da equação: $IM = (\text{número de células em mitose} / \text{número total de células analisadas por grupo}) \times 100$ (Oliveira *et al.*, 1996).

4.3 Análise estatística dos dados

Inicialmente, foi avaliada a distribuição dos dados por meio do teste de Shapiro Wilk, a fim de determinar o tipo de teste estatístico adequado aos dados obtidos. Para a avaliação da influência dos tratamentos no crescimento das raízes de *A. cepa* foi utilizado o teste ANOVA *one-way*, com test post-hoc de Tamhane T2. Para a avaliação do efeito dos tratamentos na distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular foi utilizado o teste t de *Mann Whitney*. Diferenças estatisticamente significativas foram representadas por $p < 0,05$. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. As análises foram realizadas no *GraphPad Prism* 8.0.1.

4.4 Predição *in silico* da toxicidade metabólica da proteína PaOLP

Para complementar os dados obtidos no bioensaio, foi realizada a predição da toxicidade da proteína PaOLP, por meio da plataforma ToxinPred2 (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/toxinpred2/>).

A técnica selecionada foi a abordagem híbrida, que integra três métodos diferentes: abordagem baseada em similaridade usando a busca de Alinhamento Local Básico, abordagem baseada em motivo usando utilizando o *Motif-EmeRging* e a ferramenta *Classes-Identification* e Classificadores baseados em aprendizado de máquina técnica, pois segundo Sharma *et al.* (2022), este foi o modelo que apresentou o mais alto desempenho com sensibilidade e especificidade equilibradas e maior precisão. O valor do limite usado foi de 0,6.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Concentração de proteínas totais

Após a indução da expressão e extração das proteínas solúveis, obteve-se os extratos proteicos de M15 PaOLP induzida, M15 PaOLP não induzida, M15 induzida e M15 não induzida. A tabela 1 representa a quantidade de proteínas totais (mg/mL) presente nos extratos. A partir desses dados, foi possível determinar a concentração a ser utilizada no tratamento das raízes.

Tabela 1. Concentração de proteínas totais nos extratos.

Extratos	Concentração de proteínas
PaOLP induzida	4,721 mg/mL
PaOLP não induzida	5,225 mg/mL
M15 induzida	4,546 mg/mL
M15 não induzida	4,827 mg/mL

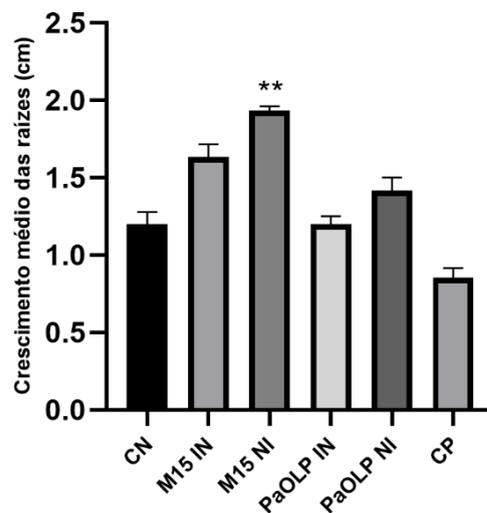
Fonte: Dados da pesquisa.

5.2 Dados obtidos pelo bioensaio em *A. cepa*

5.2.1 Análise da influência dos tratamentos nos crescimento das raízes

Após 24 horas de tratamento, como mostra a Figura 8, apenas no grupo M15 não induzido foi observada ação proliferativa das raízes ($p=0,0039$), em comparação com o CN.

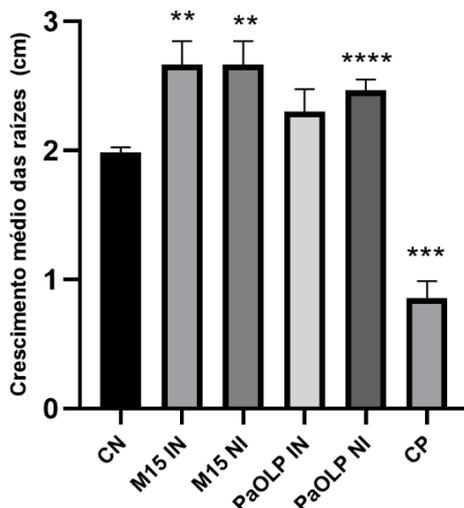
Figura 8. Efeito dos tratamentos sobre o crescimento de raízes de *A. cepa*, em 24 h.



Legenda: CN: controle negativo; M15 IN: M15 induzido; M15 NI: M15 não induzido; PaOLP IN: PaOLP induzido; PaOLP NI: PaOLP não induzido; CP: controle positivo. Análise por meio do ANOVA *one-way*, com test post-hoc de Tamhane T2. **: diferença estatisticamente significativa em relação ao CN ($p=0,0039$). Fonte: dados da pesquisa.

Após 48 horas de tratamento, como demonstra a figura 9, os grupos M15 induzido ($p=0,0027$), M15 não induzido ($p=0,0027$) e PaOLP não induzido ($p=0,0002$) apresentaram crescimento das raízes superiores ao CN, indicando ação proliferativa. Já o CP apresentou ação antiproliferativa ($p=0,0001$), sendo um resultado esperado devido a toxicidade do sulfato de cobre.

Figura 9. Efeito dos tratamentos sobre o crescimento de raízes de *A. cepa*, em 48 h.



Legenda: CN: controle negativo; M15 IN: M15 induzido; M15 NI: M15 não induzido; PaOLP IN: PaOLP induzido; PaOLP NI: PaOLP não induzido; CP: controle positivo. Análise por meio do ANOVA *one-way*, com test post-hoc de Tamhane T2. **: diferença estatisticamente significativa em relação ao CN ($p=0,0027$); ***: diferença estatisticamente significativa em relação ao CN ($p=0,0002$); ****: diferença estatisticamente significativa em relação ao CN ($p<0,0001$). Fonte: dados da pesquisa.

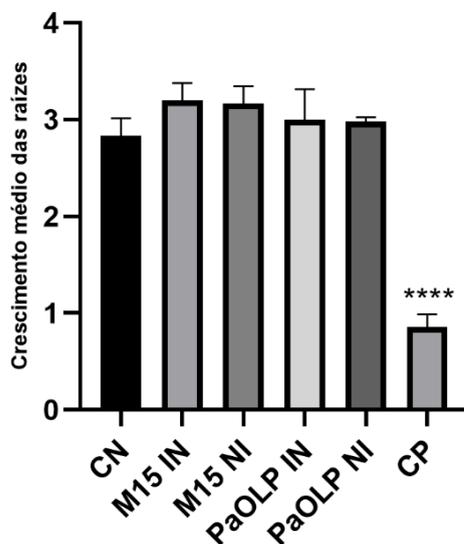
A ação proliferativa observada em alguns tratamentos ao longo do tempo, entre 24 h e 48 h é um dado relevante, pois indica que os extratos não afetaram negativamente o crescimento das raízes, uma vez que este é um parâmetro para avaliação de citotoxicidade.

A indução no crescimento radicular pode ser explicada pela presença de macronutrientes inorgânicos, como fósforo presente no tampão de lise, que pode causar o alongamento das raízes da cebola (Rodrigues e Bianchini, 2007). Ademais, substâncias liberadas pela própria *E.coli* podem ter favorecido o crescimento das raízes.

Além disso, o sulfato de cobre demonstrou ação dependente do tempo, tendo em vista que seus efeitos tóxicos só foram observados após 48 horas. Silva *et al.* (2022) afirmam ainda a característica de ação dependente da dose do sulfato de cobre, em sistemas de raízes de *Allium cepa*.

Após 72 horas de tratamento, como demonstra a figura 10, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, no qual o crescimento das raízes de todos os grupos se mostraram equivalentes, exceto o CP, que continuou apresentando ação antiproliferativa ($p < 0,0001$).

Figura 10. Efeito dos tratamentos sobre o crescimento de raízes de *A. cepa*, em 72 h.



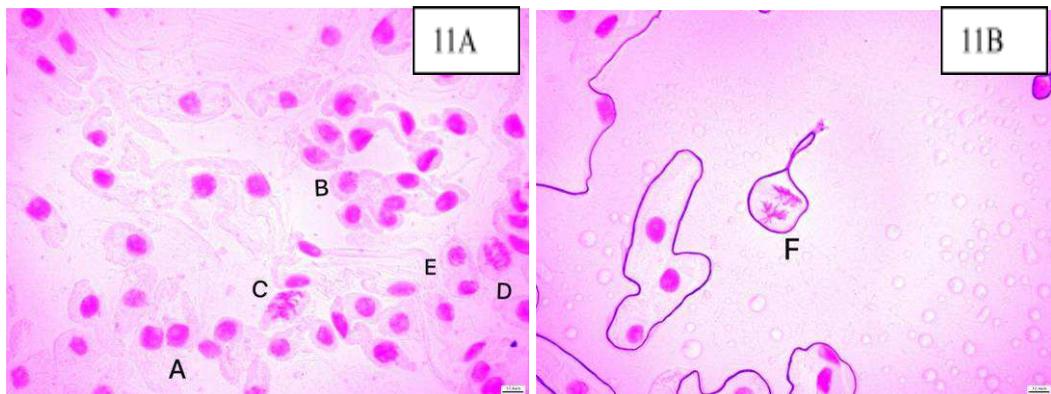
Legenda: CN: controle negativo; M15 IN: M15 induzido; M15 NI: M15 não induzido; PaOLP IN: PaOLP induzido; PaOLP NI: PaOLP não induzido; CP: controle positivo. Análise por meio do ANOVA *one-way*, com test post-hoc de Tamhane T2. ****: diferença estatisticamente significativa em relação ao CN ($p < 0,0001$). Fonte: dados da pesquisa.

Desse modo, não foram observados efeitos citotóxicos para nenhum dos extratos testados, uma vez que o crescimento radicular das cebolas não foi comprometido, exceto para o grupo CP.

5.2.2 Análise da influência dos tratamentos no ciclo celular

Durante a análise microscópica das lâminas de raízes de *A. cepa*, foram quantificados o número de células em cada uma das fases da mitose: intérfase, prófase, prometáfase, metáfase, telófase e anáfase, representadas nas imagens 11A e 11B, para posterior avaliação do número de células em 72 h de tratamento e do índice mitótico.

Figura 11A e 11B: Fases da divisão celular



Legenda: A) intérfase; B) prófase; C) prometáfase; D) metáfase; E) telófase; F) anáfase.

Fonte: Dados da pesquisa.

A tabela 02 demonstra o número de células presentes em cada fase da mitose, após 72 horas de tratamento. Os grupos que foram tratados com os extratos proteicos de M15 induzido e M15 não induzido, o ciclo celular foi interrompido em prófase. O grupo PaOLP induzido apresentou interrupção em metáfase. O grupo PaOLP não induzido apresentou células em intérfase, prófase, prometáfase, metáfase e telófase. Já no grupo CP, o ciclo celular foi inibido ($p=0,0152$), devido à citotoxicidade do sulfato de cobre.

Tabela 02. Número de células de raízes de *A. cepa* em diferentes fases do ciclo celular, em 72 h de tratamento.

Tratamentos	Nº de células em intérfase	Nº de células em prófase	Nº de células em prometáfase	Nº de células em metáfase	Nº de células em anáfase	Nº de células em telófase
CN	1777	13	1	3	5	1
M15 IN	1793	7	0	0	0	0
M15 NI	1778	22	0	0	0	0
PaOLP IN	1782	16	0	2	0	0
PaOLP NI	1778	12	4	2	0	4
CP	1800*	0	0	0	0	0

Legenda: CN: controle negativo; M15 IN: M15 induzido; M15 NI: M15 não induzido; PaOLP IN: PaOLP induzido; PaOLP NI: PaOLP não induzido; CP: controle positivo. Análise por meio do teste t de Mann Whitney. *: diferença estatisticamente significativa em relação ao CN (p= 0,0152).

Em todos os grupos, há predomínio de células em interfase, sendo um resultado esperado, por ser a fase mais longa do ciclo celular (Moreira, 2015). No grupo CN foram observadas células em todas as fases da mitose, indicando atividade mitótica normal, sendo novamente um resultado esperado.

De acordo com Vieira e Vicentini (1997), os agentes mutagênicos podem ser identificados por meio da inibição do ciclo celular, interrupção na metáfase, alterações cromossômicas, promoção de trocas entre cromátides irmãs, entre outros efeitos. Apesar de algumas alterações observadas no ciclo celular de alguns grupos, não foram observadas outras alterações significativas para a mutagenicidade.

Já os agentes genotóxicos causam lesões no material genético, que podem ser refletidas em aberrações cromossômicas (Frota *et al.*, 2019). O surgimento de micronúcleos são resultados da quebra cromossômica, evidenciando distúrbios do processo mitótico (Grover & Kaur, 1999). No entanto, essas alterações sugestivas para genotoxicidade não foram observadas.

A tabela 3 representa o índice mitótico dos grupos, o qual é um parâmetro para a avaliação da citotoxicidade, através do seu aumento ou diminuição, determinado pelo total de células em divisão ao longo do ciclo celular (Fernandes, Mazzeo e Morales, 2007).

Ao comparar o índice mitótico dos grupos com o CN (1,27), é possível observar que apenas o grupo M15 induzido apresentou redução significativa do índice mitótico (0,38) e o grupo CP apresentou inibição da divisão celular (0,00).

Tabela 3. Índice mitótico em raízes de *A. cepa*, em 72 h de tratamento.

Tratamentos	Índice mitótico
CN	1,27
M15 IN	0,38
M15 NI	1,22
PaOLP IN	1,00
PaOLP NI	1,22
CP	0,00

Legenda: CN: controle negativo; M15 IN: M15 induzido; M15 NI: M15 não induzido; PaOLP IN: PaOLP induzido; PaOLP NI: PaOLP não induzido; CP: controle positivo. Fonte: dados da pesquisa.

5.3 Resultados da predição da toxicidade da proteína PaOLP

Pela análise na plataforma ToxinPred2, na configuração supracitada, a pontuação híbrida para toxicidade da proteína PaOLP foi de 0,87, indicando que é uma proteína tóxica.

No entanto, como as proteínas do tipo osmotina fazem parte da imunidade inata das plantas, elas estão naturalmente presentes em baixas quantidades nas raízes de *Allium cepa*. Sendo assim, a concentração testada neste trabalho, não foi capaz de manifestar os efeitos tóxicos nas raízes de *Allium cepa*. Desse modo, evidencia-se a necessidade de novas pesquisas envolvendo PaOLP, utilizando diferentes concentrações para os tratamentos.

6. CONCLUSÃO

Através da análise dos resultados, não foram observados sinais de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade nas raízes de *Allium cepa* que receberam os tratamentos com os extratos proteicos contendo PaOLP induzido, PaOLP não induzido, M15 induzido e M15 não induzido. Apesar de que, em alguns grupos a divisão celular foi afetada, no entanto, o crescimento das raízes não foi negativamente prejudicado e não foram observadas a presença de alterações cromossômicas e nucleares.

A análise *in silico* da proteína PaOLP indicou toxicidade, no entanto, na concentração usada neste trabalho, não foram observados efeitos tóxicos. Desse modo, os dados dessa pesquisa contribuem para o direcionamento de novas pesquisas de interesse biotecnológico envolvendo PaOLP, através de testes utilizando concentrações maiores e testes em culturas de células de animais e *in vivo*.

7 REFERÊNCIAS

- ABDIN, M. Z. KIRAN, U. ALAM, A. Analysis of osmotin, a PR protein as metabolic modulator in plants. **Bioinformation**, v. 5, n. 8, p. 336–340, 2011.
- ABREU, R. A., *et al.* Cloning and molecular characterization of a gene encoding an osmotin-like protein from *Physalis angulata* genome. **Sociedade Brasileira de Genética**, v.1, p. 118-118, 2012.
- AHMAD, A., *et al.* Adiponectin homolog novel osmotin protects obesity/diabetes-induced NAFLD by upregulating AdipoRs/PPAR α signaling in ob/obanddb/dB transgenic mouse models. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 90, p. 31-43, 2019.
- AISIKI, G. *et al.* Correlation analysis of obesity phenotypes with leptin and adiponectin. **Scientific Reports**, v. 13, p. 1-7, 2023.
- ALIAS, C. *et al.* *Allium cepa* tests: A plant-based tool for the early evaluation of toxicity and genotoxicity of newly synthesized antifungal molecules. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 889, 2023.
- BASHIR, M. A. Osmotin: A Cationic Protein Leads to Improve Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants. **Plants**, v. 9, n. 8, 2020.
- BATISTA, G. B. Análise estrutural e funcional *in silico* de uma PR-5 do tipo osmotina de *Physalis angulata* com potencial atividade farmacológica. **Sistema de Bibliotecas da UFCG**, 2015.
- BATISTA, G. B. Expressão heteróloga da proteína PR-5 PaOLP em *Escherichia coli*. Dissertação. Curso de Mestrado em Ciências Naturais e Biotecnologia. **Centro de Educação e Saúde/UFCG**, 2018.
- BIANCHINI, A. Extraction and Concentration of Freshwater – and Seawater – Derived Dissolved Organic Matter for Use in Aquatic Toxicology Studies. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 3, p. 275-281, 2007.
- CHOI, H. M.; DOSS, H. M.; KIM, K. S. Multifaceted Physiological Roles of Adiponectin in Inflammation and Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, 2020.
- ELE, L. *et al.* The role of adiponectin in the association between abdominal obesity and type 2 diabetes: a mediation analysis among 232.438 Chinese participants. **Frontiers in Endocrinology**, v. 15, 2024.

- FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MORALES, M. A. M. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.
- FROTA, R. G. *et al.* Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da infusão de *Plectranthus barbatus* – Lamiaceae (malva-santa) avaliados pelo sistema teste *Allium cepa*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, 2019.
- GROVER, I. S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 183-188, 1999.
- HAN, Y. *et al.* New advances of adiponectin in regulating obesity and related metabolic syndromes, v. 14, n. 5, 2024.
- JO, M. G. *et al.* Adiponectin homolog osmotin, a potential anti-obesity compound, suppresses abdominal fat accumulation in C57BL/6 mice on high-fat diet and in 3T3-L1 adipocytes. **Nature**, v. 43, n. 12, p. 2422-2433, 2019.
- KADOWAKI, T. YAMAUCHI, T. Adiponectin and adiponectin receptors. **Endocrine reviews**, v. 26, n. 3, 2005.
- KALKMAN, H. O. An Explanation for the Adiponectin Paradox. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 12, 2021.
- KIM, J. Y. *et al.* Adiponectin: The Potential Regulator and Therapeutic Target of Obesity and Alzheimer's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, 2020.
- KRUGER, R. A. Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa*. **Feevale**, 2009.
- KUMAR, S. A. Osmotin: a plant sentinel and a possible agonist of mammalian adiponectin. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015.
- LAVANDEIRA, F. M. F. Ensaios toxicológicos pré-clínicos na avaliação da segurança de novos fármacos. **Faculdade de Ciências da Saúde**, 2014.
- LIU, J. *et al.* Osmotin protects H9c2 cells from simulated is chemiareperfusion injury through AdipoR1 / PI3K / AKT signaling pathway. **Frontiers in Physiology**, 2017.
- LIU, L. *et al.* Adipokines, adiposity, and atherosclerosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 79, n. 5, 2022.

- MIELE, M. CONSTANTINI, S. COLONNA, G. Structural and Functional Similarities between Osmotin from *Nicotiana Tabacum* Seeds and Human Adiponectin. **PLoS One**, v. 6, n. 2, 2011.
- MOREIRA, C. Interfase. **Revista de Ciência Elementar**, v. 3, n. 4, 2015.
- NEFIC, H. *et al.* Chromosomal and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* L. induced by alprazolam. **Medical Archives**, v. 67, n. 6, p. 388, 2013.
- NGUYEN, T. M. D. Adiponectin: Role in Physiology and Pathophysiology. **International Journal of Preventive Medicine**, 2020.
- OLIVEIRA, V. R. *et al.* Efeito do herbicida trifluralin sobre a germinação de sementes e índice mitótico em raízes de milho (*Zea mays* L.). **Revista UNIMAR**, v. 18, n. 3, p. 537-544, 1996.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Plano de aceleração para acabar com a obesidade 2023. Genebra: OMS, 2023.
- PANT, R. *et al.* Epigenetic regulation of adipogenesis in development of metabolic syndrome. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 2021.
- PINHO, K. H. S. PAIVA, M. J. OLIVEIRA, R. A. C. Leptina e adiponectina: papel dos hormônios nos processos metabólicos e impactos na sua desregulação. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, 2022.
- QIAGEN. The QIAexpressionist™ A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. **Qiagen**, 2003.
- RAMAKRISHNAN, N. *et al.* Biochemistry, Adiponectin. **StatPearls Publishing**, 2025.
- SHARMA, N. *et al.* ToxinPred2: an improved method for predicting toxicity of proteins. **Briefings in Bioinformatics**, v. 23, n. 5, 2022.
- SILVA, G. M. *et al.* Efeito da intoxicação por cobre no crescimento radicular de *Allium cepa*. In: Anais Simpósio de Gestão Ambiental e Biodiversidade, 2021.
- TAKAHASHI, Y. *et al.* Novel phytopeptide osmotin mimics preventive effects of adiponectin on vascular inflammation and atherosclerosis. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 83, p. 128–138, 2018.
- VIEIRA, D. Vicentini, V.E.P. Estudo do efeito mutagênico do floxacina em *Allium cepa* Genet Mol Biol Supplement. 42º Congresso Nacional de Genética, Goiânia, Brazil, 1997.

VIKTOROVA, J. *et al.* New findings in potential applications of tobacco osmotin. **Protein Expression and Purification**, v. 129, p. 84-93, 2017.

ZHANG, X. Excess body weight: Novel insights into its roles in obesity comorbidities. **Seminars in Cancer Biology**, v. 92, p. 16-27, 2023.

ZHAO, S. KUSMINSKI, C. M. SCHERER, P. E. Adiponectin, Leptin and Cardiovascular Disorders. **Circulation research**, v. 128, n. 1, p. 136-149, 2021.