UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Clonagem e expressão heteróloga da hialuronidase e/ou novas
toxinas obtidas a partir do transcriptoma da glândula da peçonha
de *Tityus serrulatus***

Fernanda Gobbi Amorim

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Clonagem e expressão heteróloga da hialuronidase e/ou novas toxinas
obtidas a partir do transcriptoma da glândula da peçonha de
*Tityus serrulatus***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Toxicologia para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado: Fernanda Gobbi Amorim

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani
Arantes Braga

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 04/12/2015. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Amorim, Fernanda Gobbi

Clonagem e expressão heteróloga da hialuronidase e/ou novas toxinas obtidas a partir do transcriptoma da glândula da peçonha de *Tityus serrulatus*.
Ribeirão Preto, 2015

119 p. : il. , 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia

Orientadora: **Braga, Eliane Candiani Arantes**

1. Hialuronidase. 2. *Tityus serrulatus*. 3. Transcriptoma. 4. Expressão heteróloga

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Gobbi Amorim

Clonagem e expressão heteróloga da hialuronidase e/ou novas toxinas obtidas a partir do transcriptoma da glândula da peçonha de *Tityus serrulatus*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani
Arantes Braga

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus queridos pais,
Antonio e Lela, à minha irmã Vanessa e ao
meu esposo Lucas. Essa conquista também é
de vocês! Obrigada por tudo, sempre!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por determinar a mim esse destino e colocar tantas pessoas especiais na minha vida.

Agradeço à minha família por todo apoio e compreensão nos momentos em que estive ausente. Esta conquista é dedicada em memória ao meu querido pai Antonio, que era o meu maior incentivador para que eu seguisse esse caminho. Agradeço também às mulheres da minha vida, minha mãe Valeria e minha irmã Vanessa, por toda a força que me deram quando mais precisei e se não fosse isso eu não teria chegado até aqui. O que sou hoje é graças a vocês. É o amor de vocês que me dá forças! Amo vocês!

Ao Lucas, meu amado esposo, meu orgulho. Obrigada por ser meu companheiro em todas as jornadas e ajudar no meu crescimento pessoal e profissional. Há pessoas que entram na nossa vida para nos mostrar o melhor de nós e nos fazer bem. A felicidade só é real quando compartilhada e juntos nós vamos longe. Te amo!

À Profa. Dr^a. Eliane Candiani Arantes Braga por me aceitar no grupo de pesquisa e por embarcar no desafio desse projeto. Ser sua aluna foi um privilégio e eu sou eternamente grata por todo aprendizado e conhecimento que você permitiu que eu adquirisse. Obrigada por compreender todos os momentos em que precisei me ausentar e por nos incentivar a pensar grande. Parte do profissional que eu sou, e serei, vem do exemplo que obtive de você. Eu não poderia ter orientadora melhor que você. Obrigada por tudo!

À Profa. Dra. Simone Kashima pela coorientação e conhecimento compartilhado durante o doutorado. Muito obrigada por me receber em seu laboratório e pelo direcionamento do trabalho em uma fase tão importante.

Agradeço à amiga Dra. Virginia Mara de Deus Wagatsuma por toda a ajuda nos experimentos da biblioteca de cDNA e todas as aventuras experimentais que realizamos na busca da sequência da hialuronidase. Obrigada pela sua disponibilidade em me ajudar, sempre disposta e otimista. Não encontrei a sequência, mas ganhei uma amiga!

Ao Prof. Dr. Loic Quinton e Prof. Dr. Edwin De Pauw (Lab. Espectrometria de Massas da Universidade de Liège) por me acolherem em seu laboratório e me proporcionar a experiência única de estagiar no exterior em um grande laboratório especializado. Agradeço ao Julien Echterbille e Lisette por me ajudarem nos experimentos e aos colegas do Lab. de Espectrometria de Massas pela receptividade.

Agradeço ao Prof. Dr. Wilson Araújo de Silva Júnior e o Dr. David Santos Marco Antonio pela colaboração na análise da biblioteca de cDNA.

À amiga Dra. Cindy Hanna e ao Prof. Dr. Fernando Cunha pelos ensaios de citotoxicidade e às futuras colaborações nesse trabalho.

Agradeço aos queridos amigos Fernando, Francielle, Johara, Ernesto e Renata por serem o sorriso nos meus dias tristes. Vocês foram a minha família nesses quatro anos de doutorado e vou guardar na memória todos momentos que tivemos juntos. Sou eternamente grata por ter vocês na minha vida e por tudo que fizeram por mim. Vocês deixaram o meu Ribeirão Preto mais bonito!

Agradeço especialmente à Karla, Gisele, Johara, Renata, Manuela e Camila. Karlinha e Gi, as discussões sobre a hialuronidase e experimentos sempre foram muito enriquecedoras, parte do que eu sei hoje foi adquirido conversando com vocês. À Rê pela ideia do projeto e por todas as vezes que precisei de ajuda para solucionar os problemas que surgiam. À Jô por todo aprendizado e experiência que você me passou sobre expressão heteróloga, trabalhar em parceria com você é, no mínimo, divertido. À Manu por tantas colaborações e ideias tão produtivas. À Camis por ajudar a abrir as portas da Universidade de Liège, contribuir pela realização dessa experiência no exterior e por todo apoio durante o estágio. É muito bom ter amigas colaborando com o nosso crescimento, vocês são muito queridas!!

À Iara Aimê Cardoso pela amizade e por toda a ajuda com os meus experimentos, principalmente antes do estágio e da defesa. A vida tem dessas coisas!

Aos amigos do Laboratório de Toxinas Animais: Karlinha, Camis, Jô, Manu, Felipe, Elisa, Carol, Fer, Fran, Iara, Mateus, Er, Gi, Dora, Isa, Pri, Helô, Mari, Guilherme e Chá. Obrigada por compartilharem conhecimento, ajudas nos experimentos e, especialmente, risadas. Vocês fizeram os dias de trabalho mais divertidos e eu desejo muito sucesso para cada um de vocês! Obrigada por fazer do LTA um ambiente tão acolhedor e deixar esses 4 anos mais agradáveis!

Aos amigos de ficaram em Vitória e que me recebem de braços abertos todas as vezes que eu volto e mostram que a distância é mero detalhe na nossa amizade. Obrigada!

À minha família, meus tios, primos e avós, que participaram indiretamente dessa conquista, pela torcida, pelo apoio quando precisei e por alegrar a minha vida.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP-USP e ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia. Às queridas secretárias do serviço de pós-

graduação, Rosana Florêncio e Rosemary Ioshimine e à secretária do departamento, Maria Aparecida Segato, obrigada pela atenção e suporte por todos esses anos!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das bolsas de doutorado, do estágio no exterior e pelo auxílio regular. Bem como a CAPES e CNPq pelo apoio financeiro que permitiram a realização desse trabalho.

Obrigada à banca avaliadora desse trabalho, por todas as sugestões, críticas construtivas e pela disponibilidade.

“Trabalha e confia”

(Lema da bandeira do estado do Espírito Santo)

RESUMO

AMORIM, F.G. **Clonagem e expressão heteróloga da hialuronidase e/ou novas toxinas obtidas a partir do transcriptoma da glândula da peçonha de *Tityus serrulatus***. 2015. 121 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

As hialuronidases de peçonhas animais são capazes de clivar o hialuronan presente na matriz extracelular, facilitando a difusão das toxinas no tecido da vítima. Essas enzimas têm sido negligenciadas, devido à instabilidade enzimática e à baixa concentração na peçonha. Assim, a expressão heteróloga das hialuronidases permite a sua obtenção em quantidades que viabilizam seu estudo estrutural e funcional. Associado a isso, o transcriptoma propicia a identificação de novas toxinas e componentes de baixa proporção na peçonha. Portanto, o presente trabalho realizou o transcriptoma da glândula de peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* e a clonagem e expressão heteróloga da hialuronidase. No transcriptoma foram obtidos 558 ESTs, dos quais 61,8% correspondem às toxinas, dentre elas neurotoxinas com ação em canais iônicos, metaloproteínas, hipotensinas, peptídeos antimicrobianos, dentre outros. Foram também identificadas novas toxinas como o neuropeptídeo e Ts16.1, descritos pela primeira vez para o gênero *Tityus*. Dentre os transcritos obtidos, foi identificado apenas um clone correspondente ao C-terminal incompleto de uma hialuronidase de *T. serrulatus*. Consequentemente, foi produzido o gene sintético contendo a sequência da TsHyal-1, obtida em bancos de dados, no vetor de expressão pPICZαA para expressão heteróloga em *P. pastoris*. A rTsHyal-1 foi expressa em escala laboratorial em meio não suplementado (BMM) em pH 7,0 durante 96 h da indução com alimentação diária de metanol a 0,75%. A rTsHyal-1 foi produzida na sua forma solúvel e ativa (838,31 UTR/mg) e resultou em um rendimento proteico de 250 mg/L de material expresso. O secretoma do meio de expressão mostrou que além da rTsHyal-1, a *P. pastoris* também secreta proteínas nativas associadas à ligação do ATP, metabolismo de carboidrato e resposta ao estresse oxidativo. A rTsHyal-1 foi parcialmente purificada em troca catiônica fraca e apresentou atividade específica de 1.097,45 UTR/mg. A rTsHyal-1 apresenta massa molecular de 49,5 kDa e o tratamento com PNGase F seguido da análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF) indicou que uma possível N-glicosilação de 4,5 kDa. Adicionalmente, o sequenciamento dos digestos tríplicos da enzima realizado no MALDI-TOF e pelo Q-Exactive resultaram em 46,8% de cobertura da sequência da proteína. A rTsHyal-1 apresenta especificidade pelo substrato hialuronan, seguido da condroitina C, A e B e apresentou atividade ótima em pH 6,0 e a 40°C. Adicionalmente, o ensaio do MTT indicou que a enzima recombinante não apresenta citotoxicidade *in vitro*. Os resultados obtidos determinaram as melhores condições para a expressão heteróloga da rTsHyal-1, que corresponde à primeira hialuronidase recombinante de escorpião expressa em *P. pastoris* com atividade enzimática preservada.

Palavras chaves: hialuronidase, *Tityus serrulatus*, transcriptoma, expressão heteróloga.

ABSTRACT

AMORIM, F.G. **Cloning and heterologous expression of hyaluronidase and/or novel toxins obtained from the transcriptome of *Tityus serrulatus*' venom gland.** 2015. 121 p. Thesis (PhD). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2015.

The venom hyaluronidases of animals are able to cleave hyaluronan present in the extracellular matrix, acting as a spreading factor for the toxins into the tissues of the victim. These enzymes have been neglected due to their instability and low concentration in the venom. Thus, heterologous expression of hyaluronidases permits the obtainment of sufficient amount for structural and functional studies. Moreover, the transcriptome allows the identification of new toxins or components with low proportion in the venom. In this way, this study aimed the construction of the transcriptome of *Tityus serrulatus* venom gland and cloning/heterologous expression of hyaluronidase. In the transcriptome, 558 ESTs were identified and 61.8% corresponded to toxins, such as neurotoxins with action on ion channels, metalloproteins, hypotensins, antimicrobial peptides, among others. In addition, new toxins were identified, comprising one neuropeptide and Ts16.1, described for the first time to the genus *Tityus*. Among the obtained transcripts, one identified clone corresponded to an incomplete C-terminal of a hyaluronidase. Consequently, a synthetic gene was synthesized containing the sequence of TsHyal-1 (obtained from databases) in the pPICZαA vector for heterologous expression in *P. pastoris*. The rTsHyal-1 was expressed at laboratorial scale in unsupplemented medium (BMM) at pH 7.0 for 96 h, after induction time, with daily feeding of 0.75% methanol. The rTsHyal-1 was produced in soluble and active form (838.31 UTR/mg) and resulted in a protein yield of 0,266 mg/mL in final expressed material. Besides, the secretome of the medium showed that *P. pastoris* also secretes native proteins bound with ATP, proteins related to carbohydrate metabolism and oxidative stress response. The rTsHyal-1 was partially purified in a weak cation exchange and presented specific activity of 1097.45 UTR/mg. The rTsHyal-1 has molecular mass of 49.5 kDa and the treatment with PNGase F and analysis by mass spectrometry (MALDI-TOF) indicated a potential N-glycosylation of 4.5 kDa. Additionally, the sequencing of tryptic digests performed in the MALDI-TOF and Q-Exactive resulted in 46.8% of protein sequence coverage. The rTsHyal-1 presents substrate specificity for hyaluronan followed by chondroitin C, A and B and showed an optimum activity at pH 6.0 and 40°C. Furthermore, the MTT assay indicated that the recombinant enzyme does not display *in vitro* cytotoxicity. These results validate the biotechnological process of the heterologous expression of rTsHyal-1. This is the first recombinant hyaluronidase from scorpions expressed in *P. pastoris* system with enzymatic activity preserved.

Key words: hyaluronidase, *Tityus serrulatus*, transcriptome, heterologous expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Levantamento epidemiológico dos acidentes por animais peçonhentos no Brasil.	2
Figura 2. Espécime do escorpião <i>T. serrulatus</i> e representação das suas características morfológicas e anatômicas.	5
Figura 3. Classes de componentes mais estudadas da peçonha do escorpião <i>T. serrulatus</i> .	6
Figura 4. Substratos das hialuronidases da classe E.C.3.2.1.35.	10
Figura 5. Esquema da construção da biblioteca com o <i>In-fusionTM SMARTerTM cDNA Library Construction Kit</i> (CLONTECH Lab, EUA).	22
Figura 6. Mapa do vetor de expressão pPICZ α .	26
Figura 7. Rendimento do RNA total extraído da glândula de peçonha.	37
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1 % do RNA total de amostra obtida 120 h após o estímulo da extração da peçonha.	38
Figura 9. Produtos da PCR para determinação do número de clones recombinantes.	39
Figura 10. Tamanho (pb) dos ESTs obtidos da glândula de peçonha de <i>T. serrulatus</i> .	40
Figura 11. Representação relativa de contigs e singlets de acordo com o acúmulo de ESTs identificados na análise.	41
Figura 12. Distribuição dos ESTs analisados.	42
Figura 13. Alinhamento do contig 7 com as sequências referentes às toxinas <i>Venom neuropeptide-3</i> (gb ABR21072.1) e <i>venom neuropeptide-2</i> (gb ABR21059.1) do escorpião <i>Mesobuthus eupeus</i> e à toxina <i>orcokinin</i> (gb ADY62664.1) de <i>Hottentotta judaicus</i> .	46
Figura 14. Alinhamento do contig 18 com a toxina Ts16 (P86271) <i>T. serrulatus</i>	47
Figure 15. Distribuição dos EST de acordo com o GO para função molecular.	49
Figura 16. Proporção relativa de cada categoria baseada no banco de dados da via KEGG.	50
Figura 17. Sequência de DNA do clone 556.	54

Figura 18. Alinhamento do clone 556 e da região C-terminal da TsHyal-1 (gb AHF72517.1) e TsHyal-2 (gb AHF72516.1).	55
Figura 19. Sequência de nucleotídeos do plasmídeo recombinante pPICZαA contendo o inserto referente à sequência da TsHyal-1.	57
Figura 20. Alinhamento das isoformas de hialuronidases de <i>T. serrulatus</i> .	59
Figura 21. Representação esquemática do plasmídeo recombinante no locus <i>aox1::ARG4</i> do genoma da <i>P. pastoris</i> .	60
Figura 22. Produtos da PCR das colônias de <i>P. pastoris</i> transformadas com o plasmídeo recombinante TsHyal-1.	61
Figura 23. Triagem da expressão em pequena escala para seleção da colônia que apresenta a maior taxa de expressão da TsHyal-1.	63
Figura 24. Triagem das melhores condições de expressão da hialuronidase pela colônia 19.	64
Figura 25. Análise temporal da expressão da rTsHyal-1 em meio BMM pH7 até 96 h de indução.	67
Figura 26. SDS-PAGE para realização da zimografia e identificação de glicoproteínas pelo reagente de Shiff.	69
Figura 27. Representação do padrão de glicosilação realizado pela <i>P. pastoris</i> .	70
Figura 28. Perfil cromatográfico do fracionamento das proteínas presentes no meio de cultura em coluna CMC-52.	71
Figura 29. SDS-PAGE e zimografia com a fração C2 obtida da CMC-52.	72
Figura 30. PMF da rTsHyal-1 após a digestão com tripsina.	77
Figura 31. Peptídeos obtidos pelo aparelho Q-Exactive e analisado pelo programa PMi-Byonic.	79
Figura 32. Modelagem da TsHyal-1 com os fragmentos sequenciados pelo Q-Exactive.	80
Figura 33. Análise da glicosilação da rTsHyal-1.	81
Figura 34. Análise dos componentes do secretoma da <i>P. pastoris</i> durante a expressão da rTsHyal-1 quanto ao GO.	83
Figura 35. Atividade da rTsHyal-1 sobre diferentes substratos avaliados através da medida da diminuição de turbidez.	85
Figura 36. Determinação da atividade da rTsHyal-1 em diferentes temperaturas	86

através da medida da diminuição de turbidez.

Figura 37. Determinação da atividade da rTsHyal-1 em diferentes pHs através da medida da diminuição de turbidez. 87

Figura 38. Ensaio de citotoxicidade da rTsHyal-1 sobre células de macrófagos. 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação, manifestações clínicas e tratamento do acidente escorpiônico.	3
Tabela 2. Identificação dos contigs da biblioteca de cDNA	45
Tabela 3. Transcriptomas de diferentes espécies de escorpiões realizados até o momento.	52
Tabela 4. Recuperação proteica e atividade enzimática da rTshyal-1 obtida no processo de purificação em CMC-52 a partir do meio de cultura BMM, pH 7,0.	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

arg4: argininosuccinato liase

BCTA: brometo de cetiltrimetilamônio

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA: soro albumina bovina

C-: controle negativo

cDNA: DNA complementar

CID: *Collision-induced dissociation*

Cm: músculo compressor da glândula

Cu: cutícula

Da: Dalton

DHB: 2,5-ácido dihidroxidobenzoico

DTT: ditioneitol

EPM: erro padrão médio

ESTs: *expressed sequence tags*

FPLC: *Fast Protein Liquid Chromatography*

GlcA: D-glicuronato

GlcNAc: N-acetil-glucosamina

GO: *Gene Ontology*

HCD: *Higher energy collisional dissociation*

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente

Ign: ignorados

kDa: Kilodaltons

KEGG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

Kv: canais para potássio dependentes de voltagem

m/z: razão massa/carga

MALDI: *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*

miRNA: micro RNA

mRNA: RNA mensageiro

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazolium

Mut^S: *metanol utilization slow*

NADG: N-acetil-D-galactosamina

Nav: canais para sódio dependentes de voltagem

NGS: sequenciamentos de nova geração - *Next-Generation Sequencing*

°C: Graus centígrados

ORK: peptídeo orcokinin

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

PAM: peptídeos antimicrobianos

pb: pares de bases

pH: potencial hidrogeniônico

PM: padrão massa molecular

PMF: *Peptide mass fingerprinting*

Pts: peçonha de *Tityus serrulatus*

RISC: complexo de indução do silenciamento de RNA

rpm: rotações por minuto

rTsHyal-1: hialuronidase-1 recombinante de *T. serrulatus*

SDS: dodecil sulfato de sódio

TGF-β: fator de transformação do crescimento beta

UFC: unidade formadora de colônia

Vg: glândula de veneno

α-KTx: α-neurotoxinas com ação em canais para potássio

α-NaScTx: α-neurotoxinas com ação em canais para sódio

β-KTx: β-neurotoxinas com ação em canais para potássio

β-NaScTx: β-neurotoxinas com ação em canais para sódio

UPLC: *Ultra Performance Liquid Chromatography*

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	iv
Lista de abreviaturas e siglas.....	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Acidentes por escorpiões	1
1.2. <i>Tityus serrulatus</i> e os componentes da peçonha	4
1.3. Hialuronidases da peçonha de escorpião	9
1.4. Técnicas ômicas associadas à Toxinologia	13
1.5. Expressão heteróloga de toxinas	15
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivos gerais	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA DA GLÂNDULA DE PEÇONHA DE <i>T. serrulatus</i>	21
3.1.1. Obtenção dos espécimes de <i>T. serrulatus</i>	21
3.1.2. Isolamento do RNA das glândulas de peçonha	21
3.1.3. Construção da biblioteca de cDNA	22
3.1.4. Eletroforese em gel de agarose	23
3.1.5. Seleção dos clones	23
3.1.6. Sequenciamento dos plasmídeos	23
3.1.7. Bioinformática para análises das sequências obtidas	24
3.2. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA HIALURONIDASE RECOMBINANTE	25
3.2.1. Análise do clone da hialuronidase obtido a partir do transcriptoma da glândula de peçonha do <i>Tityus serrulatus</i>	25
3.2.2. Desenho do gene sintético da hialuronidase em vetor de expressão da <i>Pichia pastoris</i> pPICZαA	25
3.2.3. Transformação das células de <i>P. pastoris</i> e seleção das colônias recombinantes	27

3.2.4. Avaliação das condições de expressão da proteína recombinante	27
3.2.5. Expressão de proteínas em escala laboratorial	29
3.2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e densitometria	29
3.2.7. Zimografia	30
3.2.8. Identificação de glicoproteínas em gel desnaturante de poliacrilamida	30
3.2.9. Atividade da hialuronidase	31
3.2.9.1. Em placa	31
3.2.9.2. Turbidimetria	31
3.2.10. Quantificação de proteínas	32
3.2.11. Purificação da hialuronidase recombinante	32
3.2.12. Espectrometria de massas	33
3.2.12.1. <i>Peptide mass fingerprinting</i> (PMF)	33
3.2.12.2. Identificação de glicosilações	34
3.2.12.3. Secretoma da <i>P. pastoris</i> expressão em escala laboratorial	34
3.2.13. Modelagem molecular	35
3.2.14. Ensaio do MTT	35
3.2.15. Análise estatística dos resultados	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA DA GLÂNDULA DE PEÇONHA DE <i>T. serrulatus</i>	37
4.1.1. Obtenção e avaliação do rendimento de RNA total sob o estímulo da extração da peçonha	37
4.1.2. Construção da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha de <i>T. serrulatus</i>	38
4.1.3. Identificação dos clusters	41
4.1.3.1. Toxinas	41
4.1.3.2. Anotação funcional por GO e KEGG	48
4.1.4. Análise do clone da hialuronidase obtido a partir do transcriptoma da glândula de peçonha do <i>T. serrulatus</i>	54
4.2. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA HIALURONIDASE RECOMBINANTE	56
4.2.1. Desenho do gene sintético da hialuronidase em vetor de expressão da <i>P. pastoris</i>	56
4.2.2. Transformação das células de <i>P. pastoris</i>	60
4.2.3. Avaliação das condições de expressão da proteína recombinante em placa	62
4.2.4. Expressão da rTsHyal-1 em escala laboratorial	66

4.2.5. SDS-PAGE para zimografia e identificação de glicoproteínas	68
4.2.6. Purificação da rTsHyal-1	71
4.2.7. Espectrometria de massas	76
4.2.7.1. <i>Peptide mass fingerprinting</i> (PMF)	76
4.2.7.2. Identificação de glicosilações	80
4.2.7.3. Secretoma da <i>P. pastoris</i> durante a expressão da rTsHyal-1	82
4.2.8. Atividade da hialuronidase	84
4.2.8.1. Especificidade sobre diferentes substratos	84
4.2.8.2. Influência da temperatura	85
4.2.8.3. Influência do pH	86
4.2.9. Avaliação da citotoxicidade da rTsHyal-1	88
 5. CONCLUSÕES	 91
 6. REFERÊNCIAS	 95
 APÊNDICE	 114
 ANEXO	 119

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidentes por escorpiões

O envenenamento é considerado uma doença negligenciada e um problema de saúde na maioria dos países tropicais (CHIPPAUX, 2015). Anualmente, mais de um milhão de casos são registrados mundialmente, apresentando taxa de mortalidade de aproximadamente 3% (CHIPPAUX et al., 2012). No Brasil, de acordo com os dados do Ministério da Saúde, em 2014 foram registrados 87.053 casos de acidentes causados por escorpiões, sendo 99 óbitos (Fig. 1). Nos últimos 7 anos, os casos de escorpionismos ultrapassaram o dobro de casos registrados em 2007 e representam o tipo de acidente por animais peçonhentos mais frequente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Embora a região nordeste do Brasil apresente a maior incidência do escorpionismo, o maior número de acidentes por escorpião foi registrado no estado de Minas Gerais (região sudeste), totalizando 18.883 casos (Fig. 1).

Pode-se observar um aumento progressivo no registro dos acidentes por escorpiões. Isso pode ser explicado pelo aperfeiçoamento do sistema de registro desse agravado, a partir da implantação da notificação dos acidentes escorpiônicos no país em 1988, o que contribuiu para a elevação das taxas de incidência. Além disso, esse aumento pode ser decorrente das modificações do ambiente natural causadas pelo desmatamento e pelos diferentes usos do solo urbano pelo homem, ocasionando uma quebra na cadeia alimentar e acabando, também, com os locais de abrigo desses invertebrados. Com a escassez de recursos, esses animais passam a procurar alimentos e abrigos em residências, terrenos baldios e áreas em construção, facilitando, então, a ocorrência de acidentes (KOTVISKI; BARBOLA, 2013).

Os escorpiões são considerados os aracnídeos mais antigos encontrados até o momento, uma vez que a sua capacidade evolutiva e adaptativa permitiu que sobrevivessem por aproximadamente 400 milhões de anos e conservassem a sua morfologia praticamente inalterada (BRIGGS et al. 1987; LOURENÇO et al., 1994; MARCUSSI et al., 2011). Esses animais apresentam o exoesqueleto rígido que age como um revestimento protetor, além da sua forma achatada, o que permite que os mesmos habitem locais pequenos. Os escorpiões possuem umas das taxas metabólicas mais baixas do reino animal, podendo permanecer longos períodos sem se alimentar

após uma única refeição. Além disso, conservam o máximo de energia possível, evitando se locomoverem, poupando energia para sua manutenção (MARCUSI et al., 2011).

Figura 1. Levantamento epidemiológico dos acidentes por animais peçonhentos no Brasil. (A) Registro de acidentes por animais peçonhentos no período de 2007 a 2014. (B) Notificações de acidentes por escorpiões por regiões do Brasil. Ign: ignorados. Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net.

Até o presente momento, já foram descritas aproximadamente 2000 espécies de escorpiões distribuídos pelo mundo. Esses aracnídeos podem ser classificados em 7 famílias: Scorpionidae, Diplocentridae, Chactidae, Vaejovidae, Bothriuridae,

Chaerilidae e Buthidae (SCORPION FILES, 2015). As espécies mais perigosas pertencem à família Buthidae que compreende mais de 500 espécies. No Brasil, os escorpiões de maior interesse médico-científico pertencem ao gênero *Tityus* (MARCUSSE et al, 2011). Nesse gênero, existem mais de 10 espécies diferentes no Brasil, sendo os escorpiões *Tityus stigmurus*, *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus* os principais responsáveis pelos acidentes em humanos. *T. serrulatus* é considerada a espécie mais perigosa no país, responsável pelo maior número de envenenamentos (LUTZ e MELLO, 1922; PETRICEVICH; LEBRUN, 2005).

A picada pelo escorpião é caracterizada por intensa dor e os sintomas sistêmicos se desenvolvem rapidamente (COLOGNA et al., 2009; HMED et al., 2013). De acordo com as manifestações clínicas, o envenenamento por escorpião pode ser classificado em leve, moderado e grave (Tab. 1). Logo após a picada, a peçonha é rapidamente absorvida através da pele e músculos, deslocando-se para o sangue, rins, pulmão e sistema nervoso (MARCUSSE et al., 2011).

Tabela 1. Classificação, manifestações clínicas e tratamento do acidente escorpiônico.

Classificação	Manifestações clínicas	Tratamento
Leve	Dor e parestesias locais	Sintomático
Moderado	Dor local intensa associada a uma ou mais manifestações como: náuseas, vômitos, sudorese, sialorreia, agitação, taquipneia e taquicardia.	2 a 3 ampolas de soro antiescorpiônico/soro antiaracnídeo
Grave	Sintomas da forma moderada acrescidos de uma ou mais das seguintes manifestações: vômitos profusos e incoercíveis, sudorese profusa, sialorreia intensa, prostração, convulsões, coma, bradicardia, insuficiência cardíaca, edema pulmonar agudo e choque.	4 a 6 ampolas de soro antiescorpiônico/soro antiaracnídeo

Fonte: tabela adaptada de Marcussi et al., 2011.

O tratamento dos acidentes é realizado de acordo com a gravidade, sendo dividido entre sintomático (terapêutica de suporte) ou específico (soro). O tratamento sintomático é feito com a utilização de fármacos para controlar os sintomas induzidos

pela peçonha, como anestésicos sem vasoconstritores, antitérmicos, antieméticos, entre outros. Os pacientes com quadros mais graves devem ser monitorados quanto às condições cardíacas e pulmonares em unidade de tratamento intensiva e a soroterapia deve ser realizada o mais rápido possível (CUPPO et al, 2004; MARCUSSI et al., 2011).

Casos de óbitos decorrentes dos acidentes por escorpiões podem ser observados principalmente em crianças com idade inferior a 10 anos, devido a quantidade de peçonha por peso corporal da vítima. Idosos também necessitam atenção quanto ao acidente por escorpião, uma vez que esses pacientes podem apresentar maior debilidade física e propensão a, principalmente, distúrbios de pressão sanguínea. Além disso, óbitos podem ocorrer em vítimas alérgicas à peçonha de escorpião devido ao processo alérgico desencadeado por ela (CUPPO et al, 2004; MARCUSSI et al., 2011).

1.2. *Tityus serrulatus* e os componentes da peçonha

O escorpião *T. serrulatus* foi descrito pela primeira vez por Lutz e Mello em 1922 e é popularmente conhecido como escorpião amarelo, devido a sua coloração amarelada. Além disso, a espécie recebe o nome de *serrulatus* devido às serrilhas observadas nos seguimentos do metassoma do animal. Esse animal é encontrado em Goiás, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (MARCUSSE et al, 2011).

O animal adulto pode apresentar de 5-7 cm de comprimento e seu corpo é dividido em três partes: cefalotórax (prossoma, cabeça e tórax), pré-abdômen (mesossoma) e pós-abdômen (metassoma). O cefalotórax apresenta um par de pedipalpos (palpos e mão) para imobilizar e segurar a presa, um par de quelíceras (garras próximas à boca usadas para alimentação) e 4 pares de patas. A parte do pré-abdômen apresenta 7 segmentos, enquanto que o pós-abdômen possui 5, sendo o télson, localizado no último segmento do pós-abdômen, apresenta um aguilhão (COLOGNA et al., 2009) (Fig. 2).

Figura 2. Espécime do escorpião *T. serrulatus* e representação das suas características morfológicas e anatômicas. O corpo do animal é dividido em três partes sendo que o aparelho inoculador se localiza no metassoma. Esse aparelho é formado pelo aguilhão e télson, no qual apresenta duas glândulas produtoras de peçonha. À direita, é possível observar um corte transversal do télson demonstrando de fora para dentro a presença da cutícula (Cu), músculo compressor da glândula (Cm) e a glândula de veneno (Vg). Fonte: Imagem fornecida pelo Laboratório de Toxinas Animais e a representação do corte foi modificada a partir da figura de POLIS (1990).

O aparelho inoculador da peçonha do escorpião consiste em uma glândula conectada a um aguilhão presente no télson. Esse é um aparato de extrema importância para a sua sobrevivência, auxiliando na alimentação e defesa (CHIPPAUX, 2012). O télson é a base do aguilhão e nele está contida a vesícula que comporta os pares de glândulas responsáveis pela produção e armazenamento da peçonha (Fig. 2). Cada glândula é conectada através de dois canais à duas aberturas próximas à região terminal do télson, local responsável pela saída da peçonha (MARCUSSE et al., 2011).

A peçonha do escorpião *T. serrulatus* consiste em uma dispersão mucosa, opalescente, com aspecto leitoso que contém diversas enzimas, componentes de baixa massa molecular, neurotoxinas, peptídeos citolíticos e antimicrobianos, os quais, interagem em conjunto, resultando em uma extrema e rápida imobilização e/ou morte da presa (Fig. 3) (MARCUSSE et al., 2011; KUHN-NETWIG, 2003). Estima-se que a

peçonha de *T. serrulatus* possui 300 toxinas, entretanto, apenas 1% dessas moléculas foram isoladas e caracterizadas (PIMENTA et al., 2001; POSSANI et al., 1999).

Figura 3. Classes de componentes mais estudadas da peçonha do escorpião *T. serrulatus*. Imagem do acervo do Laboratório de Toxinas Animais.

A principal classe de componentes presentes na peçonha de escorpião são as neurotoxinas, que agem em canais iônicos de células excitáveis (TAN et al., 2006). Essas neurotoxinas podem atuar de forma sinérgica, modulando a função dos canais iônicos, alterando a permeabilidade do canal a íons e levando à intensa liberação de neurotransmissores, o que resulta nos principais sintomas observados no envenenamento. As neurotoxinas de escorpiões apresentam uma estrutura tridimensional estabilizada por três a quatro ligações dissulfeto, o que as tornam resistentes à degradação *in vivo* e, consequentemente, aumentam o seu tempo de interação com o canal iônico, o que eleva a sua eficácia (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013).

Na peçonha de escorpião são encontradas quatro famílias de neurotoxinas: peptídeos moduladores de canais para sódio, potássio, cloro e cálcio (HMED et al., 2013). Entre as famílias de neurotoxinas mais estudadas, presentes na peçonha de *T. serrulatus*, estão as toxinas que agem em canais para sódio e potássio. Toxinas específicas que atuam em canais para cloro e cálcio são pouco estudadas (POSSANI et al., 2000).

As α -neurotoxinas (α -NaScTx) e β -neurotoxinas (β -NaScTx) correspondem às classes de toxinas de escorpião que agem em canais para sódio dependentes de voltagem (Nav) de mamíferos. As α -NaScTx interagem com o sítio receptor 3, localizado na alça extracelular S3-S4 no domínio IV e na alça extracelular S5-S6 do

domínio I do canal do tipo Nav (MARCUSSE et al., 2011; QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013). As α -NaScTx retardam o mecanismo de inativação do canal do tipo Nav e prolongam a fase de repolarização do potencial de ação da membrana (MARCUSSE et al., 2011).

Outra classe de toxinas que agem em canais do tipo Nav são as β -NaScTx. Essas toxinas se ligam no sítio receptor 4, presente no loop extracelular que conecta os segmentos transmembranares S3 e S4 e os segmentos S1 e S2 do domínio II (MARCUSSE et al., 2011; QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013). Assim, essa classe é capaz de alterar a ativação do canal dependente de voltagem para potenciais mais negativos, causando um aumento na tendência da membrana em deflagrar potenciais espontâneos e repetitivos (MARCUSSE et al., 2011). Dentre as toxinas que agem em canais para sódio encontradas na peçonha de *T. serrulatus*, estão: Ts2, Ts3, Ts5, Ts17 e Ts18 como α -NaTx, Ts1 e Ts1-G como β -NaTx (PUCCA et al., 2015).

As neurotoxinas com ação em canais para potássio dependentes de voltagem (Kv) podem ser classificadas em α , β , γ , κ e Δ -toxinas (TYTGAT et al., 1999; CORONA et al., 2002). As α -neurotoxinas (α -KTx) realizam o bloqueio do poro no vestíbulo externo do canal e, conseqüentemente, bloqueia a condutividade iônica devido a oclusão física do poro, sem afetar a cinética do canal de ativação (GIANGIACOMO et al., 1992). Em adição às α -KTxs, as peçonhas das famílias de escorpiões Buthidae, Caraboctonidae e Scorpioninae também possuem β -KTxs (TYTGAT et al., 1999). As β -KTxs apresentam subdivisões de acordo com a similaridade entre as toxinas de outros escorpiões e, além disso, são capazes de bloquear canais específicos para potássio. β -KTxs podem apresentar ações antimicrobianas, antimaláricas e citolíticas (DIEGO-GARCÍA et al., 2008; DIEGO-GARCÍA et al., 2007; QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013). Atualmente, já foram identificadas nove toxinas com ação para canais de potássio encontradas na peçonha de *T. serrulatus*: Ts6, Ts7, Ts9, Ts15 e Ts16 classificadas como α -KTxs e Ts8, Ts19 e Ts19 Frag-I, Ts19 Frag-II como β -KTx (PUCCA et al., 2015).

As outras subclasses de toxinas com ação em canais para potássio, como γ , κ e Δ são menos estudadas. Entretanto, neurotoxinas γ -KTxs foram descritas como capazes de agir principalmente em canais do tipo hERG (CORONA et al., 2002) e foram encontradas em escorpiões do gênero *Centruroides*, *Mesobuthus* e *Buthus* (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013). As neurotoxinas κ -KTxs apresentam interação com canais do tipo Kv similar às neurotoxinas α -KTx, ambas as classes

apresentam uma díade funcional contendo lisina e um resíduo aromático/hidrofóbico que interage com o canal (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013). Por fim, as Δ -KTxs apresentam atividade *Kunitz-type* que além da atividade em canais do tipo Kv, também apresentam atividade inibidora de serinoproteases (YUAN et al., 2008).

A diversidade de toxinas que atuam em canais iônicos com alta afinidade e seletividade fornece uma variedade de possíveis moléculas que podem atuar como novas drogas terapêuticas (WULFF et al., 2009). Algumas doenças (câncer e doenças autoimunes) apresentam uma alta expressão desses canais, como por exemplo, o canal HERG, o qual está associado com o ciclo celular e com a proliferação de vários tumores. Assim, bloqueadores desse canal poderiam inibir a proliferação dessas células tumorais (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013). Além disso, devido à alta especificidade dessas toxinas aos canais iônicos, as neurotoxinas podem representar ferramentas valiosas para caracterizar as propriedades desses canais, assim como suas isoformas (BORDON et al., 2014).

Apesar das neurotoxinas presentes nas peçonhas de escorpiões serem a classe de toxinas mais estudada, já foram identificados outros componentes com diversas ações (CORDEIRO et al., 2015). Sabe-se que a peçonha de *T. serrulatus* é rica em peptídeos básicos de baixa massa molecular (MARCUSI et al., 2011). Como exemplos de componentes isolados desta mistura, estão os agentes com ação hipotensora e antimicrobiana, como as toxinas TsHpt-I e escorpine, respectivamente. TsHpt-I atua como agonista de receptor B(2) e não inibe a enzima conversora de angiotensina (VERANO-BRAGA et al., 2010). Já a escorpine, apresenta ação antimalárica e antimicrobiana (DIEGO-GARCÍA et al., 2007). Recentemente, foram identificados dois novos componentes com ação antimicrobiana, denominados TsAP1 e TsAP2, que possuem um amplo espectro de ação contra microrganismos, assim como ação antitumoral (GUO et al., 2013). Outro exemplo de componente de baixa massa molecular isolado dessa espécie é o peptídeo natriurético tipo-C que pode ser um agente terapêutico no tratamento de doenças cardiovasculares (ALVES et al., 2013). Adicionalmente, alguns peptídeos apresentam ação inibitória para proteases, como o inibidor de calicreina descrito por Ferreira et al. (1998).

Algumas peçonhas das espécies de *Tityus*, como o *T. serrulatus*, apresentam atividade proteolítica (VENANCIO et al., 2013). Já foram isoladas diversas metaloproteínases da peçonha de *T. serrulatus*, denominadas metaloserrulases. Além disso, a peçonha apresentou também, enzimas com atividade gelatinolíticas, como as

serinoproteases (FLECTHER et al., 2009; ORTIZ et al., 2013; CARMO et al., 2014; ALMEIDA et al., 2012). Outra proteína importante presente na peçonha de escorpião é a hialuronidase, considerada como “fator de espalhamento” por favorecer a absorção e dispersão da peçonha no tecido da vítima (PESSINI et al., 2001; PUKRITTAYAKAMEE et al., 1988).

1.3. Hialuronidases da peçonha de escorpião

A difusão sistêmica das toxinas no organismo da vítima durante o envenenamento por escorpião é resultante da ação de hialuronidases presentes na peçonha desses animais. As hialuronidases são endoglicosidases capazes de degradar o hialuronan, que consiste na principal glicosaminoglicana da matriz extracelular, podendo também degradar condroitina e sulfato de condroitina em menores proporções (KREIL, 1995; STERN; JEDRZEJAS, 2006). Por essa razão, estas enzimas são chamadas de “fatores de espalhamento” da peçonha (MACKESSY, 2010).

As hialuronidases de escorpião são classificadas como hialuronoglicosaminidases pertencentes à classe EC 3.2.1.35, a qual engloba as hialuronidases encontradas em espermatozoides de mamíferos, lisossomas, venenos e peçonhas animais. As enzimas dessa classe hidrolisam as ligações glicosídicas do tipo $\beta \rightarrow 1,4$ dos resíduos N-acetil- β -D-glucosamina e D-glicuronato do hialuronan, produzindo tetra e hexassacarídeos (MACKESSY, 2010). Além disso, também são capazes de hidrolisarem ligações entre sulfato de N-acetil-galactosamina e D-glicuronato da condroitina A (condroitina-4-sulfato) e condroitina C (condroitina-6-sulfato), bem como condroitina B (sulfato de dermatana ou beta-heparina) em menor quantidade (Fig. 4) (ENZYME EXPASY, 2015).

Figura 4. Substratos das hialuronidases da classe E.C.3.2.1.35. As hialuronidases de escorpião são capazes de hidrolisar a ligação $\beta 1\rightarrow4$ (em rosa) entre a N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) e D-glicuronato (GlcA) do hialuronan e em menor quantidade a ligação $\beta 1\rightarrow4$ (em rosa) entre D-glicuronato (GlcA) e N-acetil-D-galactosamina (NADG) das condroitinas A, C e B.

As hialuronidases, de maneira geral, apresentam inúmeras aplicações terapêuticas e têm sido utilizadas em diversas áreas, dentre elas na ortopedia, cirurgia, oftalmologia, dermatologia, ginecologia, oncologia, estética entre outras (MENZEL; FARR, 1998). Essas enzimas são utilizadas para: promover a reabsorção de excessos de fluidos e extravasamento de sangue nos tecidos; acelerar a absorção e diminuir o desconforto causado pela injeção subcutânea ou intramuscular; aumentar a eficiência de anestésicos e aumentar o índice terapêutico de drogas anticâncer (ROSENGREN et al., 2015; MARTINDALE, 1982; LOKESHWAR et al., 2008; OHYA; KANEKO; HAIN, 1970; PODYMA et al., 1997; PRITCHARD et al., 1994).

Adicionalmente, como já foi descrito por Bordon et al. (2012), a hialuronidase atua como redutor de edema, podendo ser utilizada em cirurgias plásticas, no tratamento de microvarizes, hemorroidas e após cirurgia coronariana (KOLBE, HAIN, 2015; JOHNSSON et al., 1999). Bitencourt et al. (2011) mostraram que o tratamento com hialuronidase de *T. serrulatus* bloqueia a fibrose e a lesão pulmonar induzidas por bleomicina e diminui a produção de TGF- β (fator de transformação do crescimento beta) e a deposição de colágeno.

A primeira hialuronidase de escorpião foi identificada na peçonha do escorpião indiano *Heterometrus scaber* em 1977, porém os autores não isolaram a enzima (NAIR; KURUP, 1975). Apenas em 1990 essa enzima foi isolada do escorpião *Heterometrus fulvipes* pela primeira vez e caracterizada quanto a sua estrutura e função (RAMANAIAH et al., 1989). Embora existam 10 depósitos das sequências de hialuronidases de escorpião em bancos de dados, até o presente momento poucos trabalhos conseguiram, de fato, purificá-la. Apenas seis hialuronidases de escorpiões foram caracterizadas quanto a sua estrutura e função e isoladas das espécies *Heterometrus fulvipes* (RAMANAIAH et al., 1989), *Tityus serrulatus* (PESSINI et al., 2001; HORTA et al., 2014), *Palamneus gravimanus* (MOREY et al., 2006), *Tityus stigmurus* (BATISTA et al., 2007), *Mesobuthus martensii* (FENG et al., 2008).

Estas enzimas apresentam massas moleculares que podem variar de 43-50 kDa a 82 kDa (PESSINI et al., 2001; HORTA et al., 2014; RAMANAIAH et al., 1989). Geralmente o pH ótimo para atividade dessas enzimas varia entre 4 a 6 e a temperatura entre 30 a 37°C, sendo que acima de 40°C a enzima perde a atividade consideravelmente (RAMANAIAH et al., 1989; PESSINI et al., 2001; MOREY et al., 2006; FENG et al., 2008). A atividade enzimática da hialuronidase também pode ser inibida por heparina, ditioneitol (DTT), flavonóides e alguns cátions, como Cu^{2+} e Fe^{3+} (RAMANAIAH et al., 1989; MOREY et al., 2006; FENG et al., 2008; PESSINI et al., 2001). Além disso, a atividade dessa enzima parece sofrer influência de variações na dieta do animal e habitat (VENANCIO et al., 2013; PUCCA et al., 2014; RODRÍGUEZ-RAVELO et al., 2013). Quanto a sua estrutura, até o presente momento nenhum cristal de hialuronidase obtida de escorpião foi obtido. As informações sobre a sua estrutura tridimensional foram obtidas a partir de modelagem molecular para as hialuronidases TsHyal-1 e TsHyal-2 de *T. serrulatus* (HORTA et al., 2014) e BmHYI de *M. martensii* (XIA et al., 2014) baseadas no modelo da hialuronidase de abelha (MARKOVIĆ-HOUSLEY et al., 2000). Essas enzimas apresentaram regiões conservadas para o seu sítio catalítico bem como regiões de glicosilação, sendo 5 possíveis sítios para BmHYI e TsHyal-1, enquanto TsHyal-2 apresenta apenas 3 sítios para N-glicosilação.

A ação da hialuronidase de *T. serrulatus* como um fator de espalhamento da peçonha foi comprovada por Pessini et al.(2001), na qual a Ts1 (principal toxina da peçonha) associada à hialuronidase foi inoculada em camundongos e foi observado que os níveis de creatina quinase, lactato de desidrogenase e aspartato aminotransferase

aumentaram rapidamente em menor período de tempo comparado aos animais que receberam apenas Ts1. Além disso, animais que receberam apenas a hialuronidase apresentaram níveis das enzimas avaliadas similares ao grupo controle, o que comprova que a hialuronidase não apresenta efeitos tóxicos. Horta et al. (2014) avaliaram o potencial dessa enzima como um novo possível alvo na soroterapia. Anticorpos anti-hialuronidase foram capazes de inibir 100% das mortes dos animais que receberam a peçonha do escorpião *T. serrulatus*.

Portanto, pode-se observar a importância terapêutica dessa enzima e a necessidade de estudos que a caracterizem, tanto estruturalmente como funcionalmente. Apesar da carência de estudos relacionados às hialuronidases de peçonhas de escorpiões, trabalhos têm demonstrado que a enzima da peçonha de *T. serrulatus* é 3,9 vezes mais ativa que a hialuronidase isolada de serpentes, como a de *Crotalus durissus terrificus* (PESSINI et al., 2001; BORDON et al., 2012). Esta alta eficiência da enzima é relevante para o envenenamento por escorpião, no qual a quantidade de peçonha inoculada é muito menor que nos acidentes ofídicos.

Embora a hialuronidase apresente um importante papel no envenenamento, a enzima tem sido negligenciada, dada à sua falta de toxicidade, como demonstrado pelo reduzido número de estudos publicados. Associado a isso, tem-se o fato de que as hialuronidases estão presentes em baixíssimas concentrações na peçonha bruta, representando 0,4% da peçonha de *T. serrulatus*, como foi relatado por Pessini et al. (2001). Além disso, essas enzimas possuem atividades específicas bastante elevadas, porém são bem instáveis (BORDON et al., 2012). Assim, a elucidação das características estruturais e funcionais de hialuronidases pode auxiliar no esclarecimento do mecanismo de ação da peçonha de *T. serrulatus* no envenenamento, colaborando para o desenvolvimento de novas terapias para tratar os casos de escorpionismo. Além dessas possibilidades, o estudo detalhado desta enzima pode revelar novos fins terapêuticos da hialuronidase, melhorando as condições de vida da população, como por exemplo, sendo adjuvantes que aliviem o desconforto causado por determinados medicamentos (BORDON et al., 2012).

A baixa proporção de proteínas com potencial terapêutico na peçonha, dentre elas a hialuronidase, impossibilita a realização de estudos aprofundados. Diante disso, as técnicas ômicas atuam como abordagens para identificar novos componentes ou aqueles que possuem baixa expressão na peçonha, auxiliando assim, na elucidação desta mistura complexa que constitui a peçonha. Os dados gerados com técnicas ômicas

permitem a realização de diversas abordagens no estudo de toxinas, seja a sua caracterização estrutural ou a possibilidade da produção da mesma por expressão heteróloga pela tecnologia do DNA recombinante.

1.4. Técnicas ômicas associadas à Toxinologia

A compreensão do genoma humano é considerada um marco na história da genética. Após esse fato, deu-se início à era *Pós-Genômica*. Nessa nova “era”, os pesquisadores buscam conhecimento bem além das informações genéticas e procuram compreender a regulação transcricional e as funções biológicas de todos os genes, as suas interações e elucidar todo o processo de controle celular e do metabolismo. Portanto, inspirado neste termo da “genômica”, várias palavras contendo o sufixo “ômica” surgiram nas últimas duas décadas, como transcriptômica, proteômica, metabolômica, glicômica, entre outras (SHI-KAI et al., 2015).

As técnicas ômicas possuem um grande potencial e inúmeras aplicações. Essas técnicas podem ser aplicadas não apenas para compreender processos fisiológicos, mas também processos patológicos, descobrir novos biomarcadores e identificar novos componentes presentes na amostra analisada. A base das estratégias ômicas é compreender um sistema complexo por completo (HORGAN; KENNY, 2011).

A maioria dos estudos envolvendo peçonhas de escorpiões buscam a identificação e caracterização de toxinas, principalmente devido a sua importância médico-científica. Diante disso, as técnicas ômicas, como proteômica e transcriptômica, atuam como abordagens valiosas, que além de permitirem avaliar o perfil de toxinas que compõem a peçonha, podem elucidar a razão pela qual a composição das peçonhas de escorpiões varia entre famílias, gêneros, espécies e indivíduos.

Desta maneira, com o advento da tecnologia de sequenciamento de DNA, é possível obter um número elevado de etiquetas de sequências expressas (*expressed sequence tags* – ESTs) que codificam toxinas. Isso permitiu descobrir novas famílias de toxinas e obter uma visão geral de todo o repertório de toxinas de diferentes espécies de animais peçonhentos (KING et al., 2015).

Existem dois tipos de bibliotecas: a biblioteca genômica que é realizada utilizando o DNA cromossomal de um organismo e a biblioteca de cDNA que representa a fração de RNA mensageiro (mRNA) de uma célula ou tecido em um tempo específico. A escolha do tipo de biblioteca depende de algumas considerações, pois o

importante é definir qual será a aplicação do produto final obtido da biblioteca. Caso o objetivo seja estudar algum mecanismo de replicação gênica ou o controle da expressão gênica, a biblioteca genômica deverá ser escolhida, já que nesse tipo de abordagem, a biblioteca também apresentará componentes não codificantes. Entretanto, se o interesse é a produção de alguma proteína recombinante, determinação da expressão gênica de algum tecido específico e de seus componentes sob um determinado tempo ou estímulo, a biblioteca de cDNA é mais apropriada (WALKER; RAPLEY, 2002).

Para os dois tipos de bibliotecas, o DNA é o material a ser analisado. Para a biblioteca genômica, deve-se isolar o DNA cromossomal de qualquer tipo de célula. Já para a biblioteca de cDNA, o material de partida é o mRNA específico de um tipo celular, em um tempo específico do desenvolvimento do organismo de interesse. (WALKER; RAPLEY, 2002).

A composição das peçonhas animais abrange desde pequenas moléculas orgânicas até proteínas complexas com mais de 100 kDa (ESCOUBAS; KING, 2009). No entanto, apesar do número limitado de classes de proteínas presentes nessas peçonhas, as funções exercidas pelas toxinas no organismo das vítimas podem ser muito mais complexas, já que as toxinas podem agir sinergicamente, potencializando determinados efeitos fisiológicos ou aumentando o espalhamento dessas moléculas (CALVETE et al., 2009). Portanto, o estudo desses componentes pode elucidar o envenenamento e auxiliar no desenvolvimento de novas terapias.

Considerando a complexidade das peçonhas animais em termos de diversidade de componentes, processos pós-traducionais, interações quaternárias e outros fatores, as abordagens bioquímicas utilizadas para obter uma visão global da peçonha tendem a ser muito trabalhosas. Por outro lado, os estudos de transcriptoma têm se mostrado rápidos e eficientes na caracterização desses componentes através da identificação do material genético das glândulas de peçonha. Além de ser uma fonte rica em sequências de RNAs referentes às toxinas, o transcriptoma permite a análise da expressão de toxinas e manipulação genética, a avaliação evolutiva do animal, bem como a elucidação de características moleculares e aspectos relevantes do funcionamento da glândula, que não são possíveis com outras técnicas (DE LIMA et al., 2009).

Adicionalmente, abordagem transcriptômica é capaz de identificar sequências de novas toxinas que não foram isoladas previamente devido ao baixo rendimento na peçonha. Esse fato pode contribuir para a caracterização de componentes com alto potencial farmacológico, revelando fortes candidatos para o desenvolvimento de novos

medicamentos ou ferramentas moleculares, além de auxiliarem na elucidação do envenenamento. Além disso, essa abordagem pode viabilizar a produção de toxinas recombinantes através da expressão heteróloga, consistindo em uma alternativa viável para a obtenção de toxinas em escala laboratorial, permitindo o estudo de suas atividades enzimáticas e biológicas.

1.5. Expressão heteróloga de toxinas

Apesar da diversidade de aplicações apresentadas pela hialuronidase de *T. serrulatus* já demonstradas, a principal dificuldade no desenvolvimento de pesquisas aplicadas na área da toxinologia deve-se às limitações na obtenção da toxina nativa. Desta forma, a expressão heteróloga de proteínas em larga escala torna-se um requisito fundamental para a obtenção da proteína em quantidades suficientes para sua caracterização (estudo das características estruturais, enzimáticas e biológicas). Assim, a produção de proteína recombinante pode viabilizar as possíveis aplicações biotecnológicas/terapêuticas das hialuronidases da peçonha de escorpião. Já foram produzidas hialuronidases recombinante de diversos organismos em diferentes sistemas heterólogos, como bactérias (FERRER et al, 2013; SKOV et al., 2006; GMACHL; KREIL et al., 1993), leveduras (REITINGER et al., 2008; JIN et al., 2014), plantas (JUNG et al. 2010), células de inseto (CLEMENT et al., 2012; SOLDATOVA et al., 2007; HOFINGER et al., 2007; NG et al., 2005; SOLDATOVA et al., 1998) e em células de mamíferos (FROST et al., 1997).

A produção de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos representou um marco na área da bioquímica, por ser capaz de produzir grandes quantidades da proteína a ser estudada. Uma das principais vantagens de realizar a expressão de proteínas recombinantes em um sistema heterólogo é a obtenção de proteínas que não apresentam um rendimento satisfatório da sua fonte natural, como muitas encontradas nas peçonhas animais (ROSANO; CECCARELLI, 2014; FERRER-MIRALLES et al., 2015).

A seleção do sistema de expressão apropriado para a proteína de interesse é essencial para a obtenção do material recombinante em larga escala com integridade funcional/estrutural preservada. A expressão em um sistema heterólogo inadequado pode resultar em baixo rendimento da expressão, além de resultar na produção de proteínas com enovelamento incorreto ou com modificações pós-traducionais inadequadas. Para a seleção do sistema de expressão deve ser considerada a massa

molecular da proteína, o número de ligações dissulfeto, o tipo de modificações pós-traducionais desejadas e o destino da proteína expressa (BRONDYK, 2009).

O sistema de expressão heterólogo mais prático é o sistema em bactéria *E. coli*. Entretanto, esse sistema não é capaz de promover modificações pós-traducionais e, além disso, a expressão em bactérias pode ocorrer em corpos de inclusão. Esse fato acarreta na necessidade de processos adicionais de solubilização e enovelamento da proteína, podendo levar a perda da atividade da proteína recombinante (HOFINGER et al., 2007). As leveduras, por outro lado, apresentam crescimento rápido e a manutenção simples do sistema, além da habilidade de fazer diversas modificações pós-traducionais realizadas por células eucarióticas superiores, como processamento proteolítico, enovelamento, formação de ligações dissulfeto e glicosilação. Adicionalmente, esse sistema de expressão é capaz de secretar a proteína recombinante para o meio de cultura, facilitando a sua obtenção e purificação (CEREGHINO; CREGG, 2000; CREGG et al., 2000; BRONDYK, 2009).

A primeira hialuronidase de peçonha produzida na sua forma recombinante foi a Dol m 2, um dos maiores alérgenos da vespa *Dolichovespula maculata*, expressa em *E. coli*, em 1995. Entretanto, a Dol m 2 foi expressa em corpos de inclusão e não foi possível obter a enzima ativa (LU et al., 1995). Em 1998, a hialuronidase de abelha foi expressa em dois sistemas diferentes, em bactérias e em células de inseto. A expressão em bactérias foi em corpos de inclusão. Entretanto, a proteína expressa em células de inseto foi utilizada para análises cristalográficas, resultando, pela primeira vez, na cristalização da hialuronidase obtida de peçonha animal (MARKOVIĆ-HOUSLEY et al., 2000).

Apesar de alguns trabalhos não apresentarem sucesso na produção da hialuronidase recombinante ativa, as enzimas encontradas na peçonha da vespa *Vespula vulgaris* (KING et al., 1996), no peixe pedra *Synanceja horrida* (NG et al., 2005), na abelha *Apis mellifera* (REITINGER et al., 2008), nas aranhas *Brachypelma vagans* (CLEMENT et al., 2012) e *Loxosceles intermedia* (FERRER et al., 2013) e na sanguessuga *Hirudo nipponia* (JIN et al., 2014) foram expressas com atividade preservada.

Neste contexto, neste trabalho foi realizado o transcriptoma da glândula de peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* com objetivo de identificar novas toxinas e a sequência de cDNA que codifica a hialuronidase, permitindo a sua expressão heteróloga em *Pichia pastoris*. A importância da expressão heteróloga de toxinas deve-se ao baixo

rendimento na purificação de proteínas na forma nativa a partir da peçonha bruta, o que dificulta a caracterização aprofundada desses componentes. Portanto, a expressão heteróloga das proteínas utilizando a tecnologia do DNA recombinante consiste em uma abordagem viável para a obtenção das mesmas em quantidades suficientes para os estudos de estrutura e função. A determinação das condições ideais do processo de expressão heteróloga em um sistema específico pode originar perspectivas para a produção dessas proteínas em escala industrial, visando sua aplicação terapêutica e biotecnológica.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo realizar a construção da biblioteca de cDNA a partir da glândula de peçonha do escorpião *T. serrulatus*, análise dos transcritos e a clonagem/expressão da hialuronidase em sistema heterólogo *Pichia pastoris*, visando a obtenção da enzima ativa para a sua caracterização funcional e estrutural.

2.2. Objetivos específicos

- Transcriptoma da glândula de peçonha do escorpião *T. serrulatus*.
- Determinação do perfil de transcritos expressos na glândula de peçonha e análise *in silico* de novas toxinas obtidas.
- Expressão heteróloga em *P. pastoris* da hialuronidase.
- Avaliação das melhores condições de expressão heteróloga: diferentes pHs, tempos e meios de cultura.
- Avaliação do secretoma da *P. pastoris* nas condições de expressão em escala laboratorial.
- Purificação da hialuronidase recombinante.
- Caracterização estrutural da hialuronidase recombinante: espectrometria de massas, eletroforese SDS-PAGE, perfil de glicosilação.
- Caracterização funcional da hialuronidase recombinante: zimografia, atividade sobre diferentes substratos, influência da temperatura e pH.
- Ensaio de citotoxicidade da hialuronidase recombinante.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA DA GLÂNDULA DE PEÇONHA DE *T. serrulatus*

A construção da biblioteca de cDNA foi realizada sob a orientação da Profa. Dra. Simone Kashima e colaboração da Dra. Virginia Mara de Deus Wagatsuma no Hemocentro de Ribeirão Preto.

3.1.1. Obtenção dos espécimes de *T. serrulatus*

Os espécimes de escorpião da espécie *T. serrulatus* foram obtidos da região de Ribeirão Preto e mantidos no serpentário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) em acordo com as normas do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) (em anexo). Somente os animais adultos foram incluídos na análise e submetidos à extração prévia da peçonha por estimulação elétrica em diferentes tempos (24 h, 72 h e 120 h) antes da remoção da glândula.

3.1.2. Isolamento do RNA das glândulas de peçonha

Primeiramente, foi analisada a influência da extração previa da peçonha por estímulo elétrico e a relação com o rendimento do RNA. Portanto, os animais foram submetidos ao estímulo elétrico (choque de 12 mV) para posterior remoção das suas glândulas para obtenção do RNA total nos seguintes tempos: 24 h, 72 h e 120 h após a extração da peçonha (télson ativo) e sem o estímulo prévio da extração da peçonha (estado basal). Dessa maneira, foram coletadas 2 glândulas (diferentes animais) para cada grupo compondo um *pool* (total de 5 grupos em tempos diferentes) para avaliação do rendimento de RNA total. Cada *pool* de glândulas referente ao tempo analisado foi triturado em nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído utilizando o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Reino Unido), seguindo as recomendações do fabricante. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro (*NANODrop 2000c*, Thermo Scientific, EUA) e mantido a -80° C até a sua utilização.

3.1.3. Construção da biblioteca de cDNA

A biblioteca foi construída utilizando o *In-fusionTM SMARTerTM cDNA Library Construction Kit* (CLONTECH Lab., EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizados o RNA total (590 ng) obtido de 4 exemplares de glândulas, retiradas 120 h após o estímulo da extração da peçonha.

A construção da biblioteca de cDNA foi realizada em 6 etapas, como ilustrado na figura 5: (1) síntese do DNA complementar a partir do RNA total; (2) amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) *long distance* com a enzima *Advantage[®] 2 Polymerase Mix*; (3) purificação do DNA utilizando o kit *CHROMA SPIN + TE-1000 Column Chromatography*; (4) clonagem no vetor pSMART2IFD; (5) transformação em *E. coli* DH10 β eletrocompetente e (6) determinação do título e amplificação dos plasmídeos da biblioteca.

A eficiência da clonagem foi mensurada por meio da determinação do número de clones recombinantes. Portanto, foram selecionadas 15 colônias aleatórias para a realização da reação da PCR de acordo com as recomendações do fabricante e submetidas à eletroforese em gel de agarose.

Figura 5. Esquema da construção da biblioteca com o *In-fusionTM SMARTerTM cDNA Library Construction Kit* (CLONTECH Lab, EUA). (1) síntese do cDNA a partir do RNA total; (2) amplificação por reação em cadeia da polimerase *long distance* com a enzima *Advantage[®] 2 Polymerase Mix*; (3) purificação do DNA pelo o kit *CHROMA SPIN+TE-1000 Column Chromatography*; (4) clonagem no vetor pSMART2IFD; (5) transformação em *E. coli* DH10 β eletrocompetente e (6) determinação do título e amplificação dos plasmídeos da biblioteca. Sequências sem o adaptador SMARTer ou incompletos são eliminados durante a purificação por pela coluna *CHROMA SPIN*. Esquema adaptado do manual (www.takarabiomed.com.cn).

3.1.4. Eletroforese em gel de agarose

A integridade do material utilizado para a construção da biblioteca e a determinação dos clones recombinantes foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1,0% e 0,8% (m/V), respectivamente. O gel foi preparado em tampão Tris-Acetato-EDTA (tris-acetato 40mM, ácido acético 20mM e EDTA 1mM) corado com *GelRed™* (Biotium, EUA) e visualizado por meio da incidência da luz ultravioleta (*ImageQuant, General Electric's Healthcare Company, EUA*).

3.1.5. Seleção dos clones

Foram selecionadas aleatoriamente 577 colônias brancas resistentes à ampicilina. Estas colônias foram adicionadas a 2 mL de *Luria Bertani Broth* contendo antibiótico ampicilina (100 µg/mL) em placas de 96 poços *deep well*, e incubadas à 37°C, por 22 h, à 235 rpm, para expansão do pré-inóculo. Após a expansão das colônias, as soluções de cada poço foram transferidas (129 µL) para uma nova placa de 96 poços *deep well* com 71 µL de glicerol 25% e armazenados em *freezer* -80°C. A placa com o volume restante de solução bacteriana foi centrifugada por 6 minutos, a 4000 rpm, para sedimentação das células. O sobrenadante foi descartado e cada colônia (poço) foi submetida à extração plasmidial por lise alcalina convencional. A qualidade e a concentração de material genético da extração plasmidial foram avaliadas em espectrofotômetro (*NANODrop 2000c, Thermo Scientific, EUA*).

3.1.6. Sequenciamento dos plasmídeos

O sequenciamento dos plasmídeos (100 ng) foi realizado pelo método da terminação de cadeia por dideoxinucleotídeo (ddNTPs) marcados com diferentes fluoróforos, seguindo o método descrito por Sanger et al. (1977). A reação do sequenciamento foi realizada utilizando o kit *Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Kit* v. 3.1 (*Life Technologies, EUA*), 500 mM do oligonucleotídeo antisense M13 e 100 ng de DNA plasmidial. Em seguida, a reação do sequenciamento foi submetida às seguintes ciclagens no termociclador (95°C por 1 min, 25 repetições de 96°C de 10 seg, 50°C por 5 seg e 60°C por 4 min).

Depois de realizada a reação do sequenciamento, os plasmídeos foram submetidos à precipitação alcoólica e, em seguida, ressuspensos em tampão próprio para o sequenciador. Os sequenciamentos foram realizados no aparelho ABI3500XL Genetic Analyzer (*Life Technologies*, EUA) no Hemocentro de Ribeirão Preto.

3.1.7. Bioinformática para análises das sequências obtidas

As análises dos ESTs (*Expressed Sequence Tags*, sequências de etiquetas expressas) obtidos foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Wilson Araújo de Silva Júnior e o Dr. David Santos Marco Antonio da FMRP-USP. Os arquivos do sequenciamento foram processados utilizando o programa *Phred* e apenas sequências com valor *Phred* igual ou superior a 20 foram utilizadas (EWING, et al, 1998a, EWING; GREEN, 1998b). Sequências correspondentes ao vetor, adaptador ou DNA proveniente de *E. coli* foram removidos utilizando o programa *Cross_Match* (<http://www.phrap.org/>) (*minscore* 20 e *minmatch* 12). O agrupamento dos ESTs (clusterização) para a formação de *contigs* (sequências consensos) foi realizado com o programa *Phrap* e os ESTs sem similaridades significantes com nenhuma das sequências analisadas foram classificados com *singlets* (sequências únicas). A anotação dos ESTs, singlets e contigs foi realizada com busca contra bancos de dados UniProt/SwissProt e NCBI, utilizando o algoritmo para família e o valor de *cutoff* do *e-value* $<10^{-4}$ e $<10^{-10}$, respectivamente para esses bancos de dados.

Após a busca em bancos de dados, foram estabelecidas três categorias para as sequências identificadas: **(1) toxinas**, para sequências com similaridade com toxinas de animais peçonhentos; **(2) não-toxinas**, para sequências com similaridades com proteínas de função celular sem evidências de toxinas; e **(3) no-hits**, para sequências sem nenhuma relação com as classificações anteriores ou sem registro em bancos de dados.

A anotação funcional dos ESTs foi realizada utilizando banco de dados Gene Ontology (The Gene Ontology Consortium, 2000) associado ao AmiGO (1.8) e Blast2GO. Para melhor compreensão das funções de cada EST foi realizado o mapeamento através da Via KEGG (OGATA et al., 1999) e os resultados foram organizados em ordem de vias bioquímicas apresentadas pelo programa. Os gráficos foram construídos utilizando os programas *GraphPad Prism* 6.01, R (3.0.3) (R Core Team, 2014) e Bioconductor libraries (GENTLEMAN et al. 2004).

Para a predição da sequência de aminoácidos foi utilizado o programa Expasy Translate (<http://web.expasy.org/translate/>). Os alinhamentos das sequências foram realizado no programa MultAlin (CORPET, 1988) e a figura criada no programa ESPript (GOUET et al., 1999). A porcentagem de identidade entre as sequências foi determinada pelo algoritmo CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

3.2. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA HIALURONIDASE RECOMBINANTE

3.2.1. Análise do clone da hialuronidase obtido a partir do transcriptoma da glândula de peçonha do *Tityus serrulatus*

O clone 556 obtido na biblioteca de cDNA foi submetido a um novo sequenciamento de DNA realizado no aparelho ABI3500XL Genetic Analyzer (Life Technologies, EUA) utilizando o kit *Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Kit* v. 3.1 (Life Technologies, EUA) e os oligonucleotídeo senso e antisenso para região M13 (500 nM).

O programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* v.7.1.3.0 foi utilizado para analisar o eletroferograma e a sequência obtida foi submetida à remoção do vetor pelo site *VecScreen* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>). A sequência resultante foi analisada contra bancos de dados do NCBI utilizando o algoritmo do BLASTN e BLASTX, para identificar produtos com identidade com um *cutoff* do *e-value* $<10^{-4}$.

A sequência foi alinhada com os depósitos que apresentaram identidade dentro do *cutoff* determinado utilizando programa MultAlin (CORPET, 1988) e a figura criada no programa ESPript (GOUET et al., 1999). A porcentagem de identidade entre as sequências foi determinada pelo algoritmo CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

3.2.2. Desenho do gene sintético da hialuronidase em vetor de expressão da *Pichia pastoris* pPICZαA

A sequência do cDNA que codifica a hialuronidase TsHyal-1 de *T. serrulatus* (gb|KF623285.1), depositada por Horta et al. (2014), foi utilizada para o desenho do gene sintético. O plasmídeo pPICZαA para a expressão na levedura *P. pastoris* (Fig. 6) foi produzido pela empresa *GeneScript Corporation* (EUA)

(http://www.genscript.com/gene_synthesis.html). A sequência de interesse foi clonada no plasmídeo de expressão entre os sítios de clivagem para as enzimas de restrição *Xho*I e *Sal*I, sem a sequência que codifica a cauda de poli-histidina. As demais características do vetor serão detalhadas na sessão *Resultados e Discussão*.

Figura 6. Mapa do vetor de expressão pPICZα. Na figura é possível observar a origem de replicação em *E. coli*, o fragmento contendo o promotor AOX1 (5'AOX1), o fator de acoplamento alfa (α -factor), a região de sítios múltiplos de clonagem, a cauda de epítipo c-myc (*c-myc epitope*), a cauda de seis resíduos de histidina (6xHis), o fator de término de transcrição AOX1 (AOX1 TT), o promotor de fator de alongamento de transcrição (Ptef1 - *transcription elongation factor 1*) e o fator de término de transcrição CYC1 de *S. cerevisiae* (CYC1 TT). Fonte: www.invitrogen.com.

3.2.3. Transformação das células de *P. pastoris* e seleção das colônias recombinantes

O plasmídeo recombinante pPICZαA-TsHyal (2 µg) contendo a sequência da TsHyal-1 foi linearizado com 20 U da enzima de restrição *PmeI* (*New England Biolabs*, Reino Unido). Esse plasmídeo linearizado foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de *P. pastoris* da linhagem KM71H, previamente tratadas com DTT (para aumentar a eficiência da transformação) e lavadas e ressuspensas em sorbitol 1 M (CREGG, 2007).

O DNA plasmidial linearizado (520 ng) foi incubado por 5 min com 40 µL de células competentes. A mistura contendo as células e o material genético foi transferida para cubetas de 0,2 cm (*Bio-Rad*, EUA) e submetida à eletroporação no equipamento *GenePulser II* (*Bio-Rad*, EUA) nas seguintes condições: 1500 V, 25 µF, 200 Ω. O mesmo procedimento foi realizado com o plasmídeo sem a adição do inserto para utilização como controle negativo de expressão. Após a eletroporação, 50, 100 e 200 µL de células foram plaqueadas em meio YPDS ágar [extrato de levedura 1% (m/V), peptona 2% (m/V), dextrose 2% (m/V), sorbitol 1 M e ágar 2% (m/V)] contendo zeocina (100 µg/mL) e incubadas a 30°C por 3 dias.

As colônias transformantes foram submetidas a PCR de colônia e o produto da reação foi visualizado em gel de agarose 1%, para a confirmação da incorporação do inserto no DNA genômico na levedura. Para essa reação foram utilizados oligonucleotídeo senso referente à região 5' da sequência da TsHyal-1 (5' CTCGAGAAAAGAGCGGATTTTAAAG 3') e oligonucleotídeo antisenso para a região 3' do gene AOX do plasmídeo (5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'), ambos a 10 mM.

3.2.4. Avaliação das condições de expressão da proteína recombinante

Para determinar a melhor condição de expressão para a proteína recombinante, foram testados diferentes meios, pHs e tempos da fase de indução da expressão heteróloga conforme descrito no manual *Easy Select Pichia Expression* (*Invitrogen*, EUA), com modificações.

As colônias que apresentaram resultado positivo para presença do inserto na análise da PCR de colônia de *P. pastoris* foram selecionadas e individualmente

inoculadas em placa *deep well* de 24 poços (*Whatman*, EUA) contendo 3 mL de meio BMGY [extrato de levedura 1% (m/V), peptona 2% (m/V), YNB 1,34% (m/V), 4×10^{-5} biotina (m/V), glicerol 1% (m/V), fosfato de potássio 100 mM pH 6,0] por poço para geração da biomassa. Como controle negativo, um clone contendo o plasmídeo pPICZαA sem incorporação do cassete de expressão foi inoculado nas mesmas condições descritas. A placa de triagem foi incubada a 30°C sob agitação constante de 190 rpm.

Após 48 h, as culturas foram centrifugadas a 1500 xg e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 2 mL de meio BMMY [extrato de levedura 1% (m/V), peptona 2% (m/V), YNB 1,34% (m/V), 4×10^{-5} biotina (m/V), metanol 0,5% (V/V), fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0], para a indução da expressão. Em seguida, as culturas foram incubadas a 26°C sob agitação constante a 190 rpm. Para a manutenção da indução, foi realizada a alimentação de metanol para a concentração final de 0,75% a cada 24 h.

As alíquotas da indução foram coletadas no tempo de 144 h, centrifugadas a 10.000 xg e os sobrenadantes foram analisados por SDS-PAGE 13,5% em condições desnaturantes, redutoras (tampão de amostra contendo 2-mercaptoetanol) e corado com prata para a determinação dos níveis de expressão. Adicionalmente, as colônias foram submetidas a avaliação da atividade hialuronidásica em placa, como descrito no item 3.2.9.1.

A colônia que apresentou maior atividade hialuronidásica foi submetida a uma nova triagem para a determinação das condições de pHs e composição do meio ideais para a obtenção da hialuronidase recombinante mais ativa. Para isso, a colônia selecionada foi inoculada nas mesmas condições descritas anteriormente, com a diferença que, após 48 h de geração de biomassa, as células foram centrifugadas e ressuspensas em meios complexos tamponados em diferentes pHs (BMMY, pH 4,0, 6,0 e 7,0), meios mínimos tamponados em diferentes pHs (BMM [YNB 1,34% (m/V), 4×10^{-5} biotina (m/V), metanol 0,5% (V/V), fosfato de potássio 100 mM], pHs 4,0, 6,0 e 7,0) e meio mínimo não tamponado (MM [YNB 1,34% (m/V), 4×10^{-5} biotina (m/V), metanol 0,5% (V/V)]). Após 96 h, 120 h e 144 h de indução, os sobrenadantes das culturas foram analisados em SDS-PAGE 13,5%, corados com prata e avaliados quanto à atividade hialuronidásica em placa. As condições que possibilitaram a expressão da proteína recombinante mais ativa e com menos contaminantes foram utilizadas para a expressão desta proteína em escala laboratorial.

3.2.5. Expressão de proteínas em escala laboratorial

A colônia selecionada na triagem em placa foi pré-inoculada em erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de meio BMGY [extrato de levedura 1% (m/V), peptona 2% (m/V), YNB 1,34% (m/V), 4×10^{-5} biotina (m/V), glicerol 1% (m/V), fosfato de potássio 100 mM pH 6,0], e incubada a 30°C sob agitação constante de 190 rpm. Após 16 h, a cultura foi inoculada em erlenmeyer de 2 L, contendo 500 mL de meio BMGY, e incubada a 30°C sob agitação constante de 190 rpm, até atingir uma densidade óptica de 2 a 6 no comprimento de onda de 600 nm. Após atingir a densidade óptica desejada, a cultura foi centrifugada a 1500 xg, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 mL de meio BMM [YNB 1,34% (m/V), 4×10^{-5} biotina (m/V), metanol 0,5% (V/V), fosfato de potássio 100 mM pH 7,0] em erlenmeyer de 1 L à 26°C sob agitação constante de 190 rpm.

Para a manutenção da indução, foi realizada reposição de metanol para a concentração final de 0,75% a cada 24 h. A cada dia da indução da expressão, foram coletados 1 mL do meio para quantificação proteica, avaliação da atividade hialuronidásica e para realização de SDS-PAGE. Após 96 h de indução, a cultura foi centrifugada a 3.000 xg, o sobrenadante foi filtrado em membrana de poro de 0,4 µm e armazenado a 4°C. Esse material foi utilizado para a purificação da proteína recombinante.

3.2.6. Eletroforese em gel de poli(acrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e densitometria

Os meios de expressão e a proteína recombinante foram avaliados em gel de poli(acrilamida a 13,5% (m/V) em condições desnaturantes e redutoras, na presença de SDS e 2-mercaptoetanol como descrito por Laemmli (1970). A eletroforese foi realizada seguindo as seguintes condições: tensão de 120 V, corrente elétrica de 40 mA e potência de 10 W por 1 hora e 10 minutos. Os géis foram corados com *PlusOne Coomassie Blue PhastGel® R-350* (GE Healthcare, Suécia) ou prata, dependendo da quantidade de proteína aplicada. Como marcador de massa molecular foi utilizado o marcador de massa molecular da GE Healthcare (Suécia).

A análise densitométrica foi realizada usando um densitômetro DenGo (*Qualitem*, Brasil) para eletroforese em gel e o programa que acompanha o equipamento.

3.2.7. Zimografia

A zimografia foi realizada de acordo com o método desenvolvido por Cevallos et al. (1992), baseado no sistema de eletroforese descrito por Laemmli (1970), com adaptações. Neste método, o ácido hialurônico (0,4 mg/mL) foi incorporado à matriz do gel durante a polimerização. As amostras analisadas não sofreram redução por 2-mercaptoetanol.

3.2.8. Identificação de glicoproteínas em gel desnaturante de poliacrilamida

Para identificação de glicoproteínas, o meio de expressão foi submetido a uma SDS-PAGE 13,5%, como descrito por Laemmli (1970). Após a eletroforese, o gel foi colocado em solução fixadora contendo ácido acético 10% (V/V) e metanol 35% (V/V) em água e incubado por 2 h. Em seguida, o gel foi lavado com água destilada e deixado por 1 h em solução de ácido periódico 0,7% (m/V) e ácido acético 5% (V/V). Posteriormente, o gel foi lavado com água destilada e deixado por duas vezes (10 min cada) em solução de metabissulfito de sódio 0,2% (m/V) e ácido acético 5% (V/V). Após esse período, o gel foi corado com ácido periódico-reagente de Schiff (*PAS stain* ou *periodic acid-Schiff stain*), com modificações do método descrito por Doerner e White (1990), e mantido no escuro por 2 h. O gel foi lavado com água destilada por várias vezes até que fosse definida a coloração rósea das bandas de glicoproteínas (cerca de 1 h e 30 min).

Para o preparo do reagente de Schiff foi utilizado 1 g de fucsina básica adicionada à 200 mL de água fervente. Após 5 minutos de fervura, a solução foi resfriada a 50°C em banho com gelo e filtrada em papel de filtro. Em seguida, foram adicionados 20 mL de HCl 1 N ao filtrado e, ao atingir a temperatura ambiente, acrescentou-se 1,7 g de metabissulfito de sódio. Antes da utilização dessa solução para corar o gel, esta solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar e deixada a temperatura ambiente, em repouso, por 16 h.

3.2.9. Atividade da hialuronidase

3.2.9.1. Em placa

A atividade hialuronidásica foi avaliada qualitativamente por ensaio em placa de acordo com Richman e Bae (1980) com modificações. Para esse ensaio, foi preparada uma placa contendo hialuronan 1 mg/mL, agarose 1,5% (m/V), citrato de sódio 50 mM, pH 5,5, NaCl 0,15 mM e azida sódica 0,02% (m/V). Após a polimerização do material na placa, foram realizados furos de 3 mm de diâmetro e preenchidos com 10 µL dos meios de expressão. As placas foram incubadas a 37°C por 1 h e, após esse período, foi adicionada à placa uma solução de brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA) 10% (m/V). A formação de um halo translúcido em volta do poço indica a atividade hialuronidásica.

3.2.9.2. Turbidimetria

A atividade hialuronidásica foi determinada quantitativamente por turbidimetria por modificações do método de Di Ferrante (1956), como descrito por Pukrittayakamee et al. (1988) e adaptada para microplaca de fundo chato de 96 poços. Para a reação foram utilizados o tampão acetato (acetato de sódio 200 mM, NaCl 150 mM pH 6,0), 10 µg de hialuronan (0,5 mg/mL em água) e o meio de expressão ou enzima para o volume final de 200 µL. A mistura foi incubada por 30 min a 37°C e a reação foi interrompida com a adição de 200 µL de BCTA 2,5% (m/V) em NaOH 2% (m/V). Após a interrupção da reação, foi realizada a leitura da microplaca em até 10 min em leitor de microplaca (*Sunrise Tecan*, Suíça), utilizando comprimento de onda de 400 nm. A atividade hialuronidásica foi expressa como a porcentagem de hialuronan hidrolisado, considerando a absorbância do tubo no qual não foi adicionado hialuronan como 100% de hidrólise. A absorbância do tubo contendo 10 µg de hialuronan, sem adição de enzima, foi considerada como 0% de hidrólise. A unidade de redução turbidimétrica (UTR) foi expressa como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 50% do ácido hialurônico e a atividade específica representa as unidades de redução turbidimétrica por mg da enzima recombinante.

Esse ensaio foi realizado, também, para determinar as condições ideais para atividade, como pHs (3,0 a 10,0) e temperaturas de incubação (0 a 100°C), além da especificidade sobre diferentes substratos, como condroitina-4-sulfato (sulfato de

condroitina A), sulfato de dermatana (sulfato de condroitina B) e condroitina-6-sulfato (sulfato de condroitina C) (*Sigma*, EUA).

3.2.10. Quantificação de proteínas

Para a quantificação de proteínas, foram utilizados dois métodos de quantificação, sendo eles o método de SCOPES (1974) e o método de Bradford (1975). A curva padrão para esse método foi determinada a partir de diferentes concentrações de soro albumina bovina (BSA), considerando o coeficiente de extinção molar a 280 nm de $0,665 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.2.11. Purificação da hialuronidase recombinante

Para a purificação da proteína recombinante, foram utilizadas técnicas cromatográficas de troca iônica realizada em sistema de cromatografia rápida de proteínas (FPLC - *Fast Protein Liquid Chromatography*) Äkta Purifier UPC10 (*GE Healthcare*, Reino Unido). Após 96 h de indução, o meio de cultura da expressão foi centrifugado a 3.000 xg por 10 min, sendo que o sobrenadante foi separado, filtrado em membrana de poro de 0,4 μm . Em seguida, o meio de cultura da expressão foi dialisado contra água por 24 h em ambiente refrigerado, com quatro trocas de água.

Após a diálise, o meio foi aplicado em coluna C10/40 (*GE Healthcare*, Reino Unido) de dimensões 1 x 40 cm empacotada com resina troca iônica CM-celulose-52 microgranular (*GE Healthcare*, Reino Unido). A coluna de troca catiônica foi previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0 (tampão A). A amostra foi aplicada manualmente à coluna conectada ao sistema FPLC e as absorbâncias foram monitoradas automaticamente em 280 nm. A eluição foi realizada com gradiente segmentado até atingir 100% de acetato de sódio 1 M, pH 6,0 (tampão B), a uma vazão de 0,5 mL/min, coletando 1 mL por tubo. As frações obtidas foram concentradas em membrana *Centricon*® (*Millipore*, EUA) de porosidade controlada para 3 kDa e submetidas à análise quanto a atividade hialuronidásica. A pureza da proteína foi verificada pela SDS-PAGE.

3.2.12. Espectrometria de massas

As análises envolvendo espectrometria de massas foram realizadas durante o doutorado sanduíche da aluna no Laboratório de Espectrometria de Massas da Universidade de Liège (Bélgica) sob a orientação dos Prof. Dr. Edwin De Pauw e Prof. Dr. Loic Quinton.

3.2.12.1. *Peptide mass fingerprinting* (PMF)

Para análise do PMF, a hialuronidase recombinante extraída da SDS-PAGE foi submetida à redução, alquilação e digestão enzimática. Para tanto, 5 µg amostra foi reduzida com 2 µL DTT 100 mM e 6 µL de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 50 mM, pH 7,8, e incubada por 1 h a 58°C. Em seguida, a amostra foi alquilada com 2 µL de iodoacetoamida (IAA) 500 mM por 1h à temperatura ambiente no escuro. Após essa etapa, a proteína recombinante foi digerida com tripsina (*Sigma*, EUA) em NH_4HCO_3 50 mM, em uma relação de 1:30 (tripsina/proteína m/m), por 4 h a 37°C. Após a digestão, a reação foi interrompida com adição de ácido fórmico 1% (concentração final) e submetida à dessalinização em colunas ZipTip C18 (*Sigma*, EUA) com eluição em uma solução de acetonitrila/água/ácido fórmico (49,8/50/0,2 V/V). Essa amostra foi analisada por MALDI-TOF Ultraflex II (*Bruker*, EUA) utilizando a matriz 2,5-ácido dihidroxidobenzoico (DHB) operado no modo positivo linear. O PMF obtido foi analisado utilizando os programas *FlexAnalysis 3.0*, *BioTools 3.2* e *Sequence Editor*.

3.2.12.2. Identificação de glicosilações

Aproximadamente 2 µg da hialuronidase recombinante extraída do SDS-PAGE foi submetida a digestão pela enzima PNGase F (*Sigma*, EUA) em duas etapas. Primeiramente, a proteína foi incubada com 5 U de PNGase F em tampão NH_4HCO_3 50 mM, por 8 h a 37°C. Em seguida, foram adicionadas mais 3 U da enzima no mesmo tampão na amostra a qual foi incubada por 16 h a 37°C. Após esse período, a reação foi interrompida com adição de ácido fórmico 1% (concentração final) e submetida à dessalinização por colunas ZipTip C18 (*Sigma*, EUA) com eluição em uma solução de acetonitrila/água/ácido fórmico (49,8/50/0,2 V/V). Essa amostra foi analisada por MALDI-TOF Ultraflex II (*Bruker*, EUA) operado no modo positivo linear, utilizando a

matriz DHB. O espectro de massas obtido foi analisado utilizando o programa *FlexAnalysis 3.0*.

3.2.12.3. Secretoma da *P. pastoris* expressão em escala laboratorial

O meio de cultura obtido ao final da expressão heteróloga foi analisado por espectrometria de massas com o objetivo de confirmar a expressão da hialuronidase recombinante e avaliar o perfil de proteínas nativas secretadas pela *P. pastoris*. O total de 5 µg do meio liofilizado foi reduzido com 2 µL DTT 250 mM e 6 µL de NH₄HCO₃ 100 mM pH 7,8, e incubado por 1 h a 56°C. Em seguida, a amostra foi alquilada com 2 µL de IAA 500 mM, por 1 h à temperatura ambiente no escuro. Após a alquilação, o material foi precipitado com o kit *2-D Clean Up* (GE Healthcare, Reino Unido) seguindo as recomendações do fabricante. Após essa etapa, o material foi ressuspendido em NH₄HCO₃ 50 mM e pH 7,8 seguido da digestão com tripsina (*Sigma*, EUA) em NH₄HCO₃ 50 mM e pH 7,8, em uma relação de 1:80 (tripsina/proteína m/m), por 5 h a 37°C. Ao final da digestão, a reação foi interrompida com adição de ácido fórmico 1% (concentração final) e submetida à dessalinização em colunas ZipTip C18 (*Sigma*, EUA) com eluição em uma solução de acetonitrila/água/ácido fórmico (49,8/50/0,2 V/V).

O meio da expressão foi analisado utilizando um ULPC nanoACQUITY (*Waters*, Reino Unido) acoplado a um espectrômetro de massa Q-Exactive Orbitrap (*Thermo Scientific*, EUA). O sistema cromatográfico é equipado com uma coluna capilar PepSwift monolítico de 100 µm x 5 cm (*Thermo Scientific*, EUA). A eluição dos peptídeos foi realizada com gradiente de 3-50% de solução B em 80 minutos (A: água/ácido fórmico 0,1%; B: acetonitrila) em um fluxo de 0,7 mL/min. Os dados brutos foram carregados analisados pelo programa *Pmi-Byonic* com base nos depósitos em bancos de dados do UNIPROT (www.uniprot.org).

3.2.13. Modelagem molecular

A modelagem molecular da estrutura tridimensional da TsHyal-1 (depósito P85841) foi realizada pelo programa online *Phyre2* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) com base nas estruturas

depositadas em bancos de dados. O modelo proposto foi editado utilizando o programa *Discovery Studio 4.1 Visualizer*.

3.2.14. Ensaio do MTT

Para a avaliação da citotoxicidade da proteína recombinante, foi utilizado o método colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazolium) (*Sigma*, EUA) como descrito por Monsmann (1983). Esse ensaio consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Para tanto, uma suspensão de macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem C57bl/6 foi extraída e plaqueada em placa de 96 poços (200.000 células/poço) seguido da adição da proteína recombinante em diversas concentrações (ensaio quadruplicada) e mantido em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Após 4 h foi adicionado uma solução de 20 µL de MTT (5 mg/mL) à cultura de macrófagos, seguida da incubação por mais 2 h a 37°C. Ao final da reação, foram adicionados 200 uL de etanol absoluto à cultura para a solubilização do material que foi lido em 570 nm.

3.2.15. Análise estatística dos resultados

A análise de variância estatística (ANOVA) e Teste *t-Student*, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), foram realizados com auxílio do programa *GraphPad Prism*, versão 6.0 (GraphPad Programa Inc., San Diego - USA).

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA DA GLÂNDULA DE PEÇONHA DE *T. serrulatus*

4.1.1. Obtenção e avaliação do rendimento de RNA total sob o estímulo da extração da peçonha

O RNA total foi extraído das glândulas em diferentes tempos após a estimulação da extração da peçonha (sem estímulo, 24 h, 72 h e 120 h). A quantificação do material mostrou que o maior rendimento de RNA total foi obtido após 120 h da extração da peçonha, ou seja, com o télson no seu estado ativo (Fig. 7).

A absorbância do RNA total obtido foi determinada por espectrofotometria a 260 nm e a 280 nm, e a relação entre os valores obtidos nos comprimentos de onda permitiu a quantificação do material genético e avaliação da sua qualidade. A concentração da amostra de RNA total (*pool* de 2 glândula/grupo) obtida para cada grupo de tempo foi: 16,9; 27,3; 57,8; 73,8 ng/ μ L, respectivamente. A razão 260/280 nm variou dentro do intervalo esperado de 1,7 a 2,1 para análises de RNA, indicando que a qualidade da amostra era adequada para dar continuidade aos experimentos.

Figura 7. Rendimento do RNA total extraído das glândulas de peçonha. Concentração do RNA total sem o estímulo e 24 h, 72 h e 120 h após a extração da peçonha por estímulo elétrico. Os valores representam a concentração do *pool* de 2 glândulas/grupo.

Após a retirada da peçonha por estímulo elétrico, a glândula passa para o seu estado ativo, no qual há a síntese proteica para reestabelecer a composição da peçonha e preparar o animal para um possível ataque à presa ou defesa. Portanto, é esperado um aumento progressivo de RNA total após o estímulo da extração da peçonha. Porém, após alguns dias, a glândula entra em um estado basal, no qual provavelmente a síntese proteica estabelece um platô e a composição da peçonha se mantém sem variações (RENDÓN-ANAYA et al., 2012). Para a realização dessa análise, foram adotados alguns critérios de forma a minimizar a degradação do RNA, como a utilização de materiais livres de RNases, o armazenamento da amostra a -80°C , a realização da extração do material genético logo após a retirada das glândulas, bem como a sua quantificação, e o mesmo kit de extração.

Assim, diante desse resultado, o tempo escolhido para obtenção do RNA total e construção da biblioteca foi 120 h após o estímulo da extração da peçonha. Adicionalmente, a integridade do material foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% para a construção da biblioteca de cDNA (Fig. 8). Pode-se observar a integridade do RNA total utilizado para a construção da biblioteca de cDNA pela presença das bandas ribossômicas 28 S, 18 S e 5 S.

Figura 8. RNA total de amostra obtida 120 h após o estímulo da extração da peçonha. O gel em agarose 1% foi corado com *GelRed*TM e as bandas foram visualizadas por meio da incidência da luz ultravioleta. As bandas ribossômicas 28S, 18S e 5S estão destacadas na figura.

4.1.2. Construção da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha de *T. serrulatus*

O título da biblioteca não amplificada foi de $1,2 \times 10^5$ UFC/mL com 93% dos clones recombinantes, como pode ser observado na figura 9. De acordo com o kit utilizado para construção da biblioteca, o ideal é que se obtenha no mínimo 10 clones

recombinantes do total de 15 clones escolhidos aleatoriamente. Nessa análise, 14 clones selecionados eram recombinantes. Apenas o clone 4 não apresentou banda, indicando 93% de eficiência da biblioteca de cDNA.

Figura 9. Produtos da PCR para determinação do número de clones recombinantes. Gel em agarose 0,8% dos clones selecionados aleatoriamente e enumerados de 1 a 15 e o controle negativo (c-) da reação da PCR. Marcador de massa molar Gene Ruler 1kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*).

Após descartar as sequências de baixa qualidade, menores que 100 pb e sem inserto, 558 EST das 577 sequências iniciais foram utilizadas para avaliar o perfil da expressão gênica da glândula, indicando que a biblioteca apresentou 96,7% de aproveitamento. As sequências foram tratadas manualmente e pelo programa *Cross_match* para remoção dos nucleotídeos correspondentes ao vetor. O tamanho médio dos fragmentos obtidos de cada ESTs após a remoção do vetor foi de 400 pares de bases (pb) (Fig. 10). Esse resultado reflete a distribuição de toxinas encontradas na peçonha, uma vez que a mesma é composta majoritariamente por peptídeos.

Figura 10. Tamanho (pb) dos ESTs obtidos da glândula de peçonha de *T. serrulatus*. O total de 558 ESTs de alta qualidade foram usados para análise do transcriptoma e o tamanho médio dos fragmentos foi de 400 pb.

A redundância da biblioteca de cDNA foi monitorada pela adição progressiva de cluster durante a identificação das sequências (Fig. 11). Assim, foi estimado que no mínimo 500 sequências de ESTs são necessárias para fornecer uma representação adequada do transcriptoma da glândula de peçonha. Acima desse valor, a biblioteca de cDNA atinge um platô no qual novas sequências de ESTs não irão alterar a proporção relativa de contigs e singlets. Ou seja, a identificação de novas sequências se torna pouco provável deixando o transcriptoma redundante. Essa análise foi proposta por Wagstaff e Harrison em 2006, os quais obtiveram resultados semelhantes para o transcriptoma da serpente *Echis ocellatus*.

Figura 11. Representação relativa de contigs e singlets de acordo com o acúmulo de ESTs identificados na análise. Com 500 ESTs é possível obter uma representação apropriada do transcriptoma da glândula de peçonha de *T. serrulatus*.

4.1.3. Identificação dos clusters

4.1.3.1. Toxinas

Os EST foram agrupados em *No Hits*, *Toxinas* e *Não Toxinas* como demonstrado na figura 12. Pode-se observar que os transcritos identificados na biblioteca de cDNA correspondem, em sua maioria, às sequências codificadoras de toxinas (61,8%), seguido de não toxinas (26%), que compreendem proteínas celulares, secretoras e hipotéticas. As sequências que apresentaram *e-value* alto ($>10^{-4}$), ou que não possuíam identidade com nenhum depósito em bancos de dados, foram agrupadas em *No hits* e corresponderam a 12,2% de todos os transcritos.

Figura 12. Distribuição dos ESTs analisados. 61,8% dos transcritos correspondem a toxinas e essas foram identificadas em 14 classes distintas. O número de ESTs por classe de toxina está representado por um número absoluto.

Além disso, também é possível observar na figura 12 quais foram as classes de toxinas identificadas. Assim, os transcritos corresponderam em maior proporção a peptídeos antimicrobianos (PAM) com 58%, seguido de α -toxinas com ação para canais do tipo Kv (16,2%). Toxinas que apresentam similaridade com neurotoxinas de outras espécies de escorpiões e não com o *T. serrulatus* foram agrupadas na classe “neurotoxina símile”, constituem 10,1% dos transcritos e, correspondem a novas toxinas para essa espécie de escorpião. Em seguida, os peptídeos aniônicos representam por volta de 5% dos ESTs. Em proporções menores que 5%, foram identificadas toxinas das classes: peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP) e hipotensina (4%), β -toxinas

com ação em Kv (3%); toxinas com ação em canais do tipo Nav (2%); proteínas como metaloproteinases, serinoproteases, hialuronidase, peptídeos ricos em cisteína e neuropeptídeos, representam menos que 2% do transcriptoma.

Após a clusterização dos ESTs pelo programa *Phrap*, foram criados 34 contigs (a partir de 467 ESTs) com tamanho médio de 919 pb. Os ESTs sem similaridade significativa com outras sequências foram agrupados como singlets e constituem 91 sequências. A identificação dos contigs é apresentada na tabela 2. Algumas sequências não serão mostradas pois os ESTs estão em processo de depósito em bancos de dados.

O transcriptoma da glândula de *T. serrulatus* submetida à extração prévia da peçonha (120 h) apresenta alta expressão de componentes de baixa massa molecular, o que já é esperado, uma vez que esse fato já foi observado em análises de proteoma da peçonha de escorpiões da família Buthidae (NASCIMENTO et al., 2006; BATISTA et al., 2006; BATISTA et al., 2007). Morgenstern et al. (2011) relatam que o transcriptoma da glândula de escorpiões dessa família em seu estado ativo (estimulação prévia da extração da peçonha) apresenta um rendimento predominante de peptídeos (toxinas menores que 10 kDa). Além disso, os autores descrevem que o transcriptoma sob essas condições rendem um maior número de toxinas (44–78% do total de transcritos) em comparação com o estado basal.

A classe de PAMs foi a mais frequente nos transcritos, essa predominância já foi relatada em transcriptoma de escorpiões da família não-Buthidae (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2015; HE et al., 2013). No transcriptoma de *T. serrulatus* realizado por Alvarenga et al. (2012), observou-se alta expressão de β -KTx, seguido de α -NaTx e peptídeos PAPes e PAMs. Os resultados diferem dos obtidos nesse trabalho, uma vez que os transcriptomas foram realizados variando o período de estímulo da extração da peçonha. Alvarenga et al. (2012) realizou a extração da peçonha 48 h antes da retirada da glândula, enquanto que em nosso estudo a peçonha foi extraída 120 h antes da obtenção do RNA total. Portanto, as condições prévias às quais a glândula da peçonha foi submetida resultaram em uma alteração no padrão de transcritos da glândula.

No presente trabalho foram obtidos 10 ESTs referente a diferentes PAMs, incluindo TsAP1 e TsAP2 identificados por Guo et al. (2013). Essa classe de toxinas apresenta um papel importante no sistema imune inato do escorpião e pode despolarizar células neuronais induzindo a imobilização da presa. Podem também potencializar a ação de outras neurotoxinas, além de proteger o animal contra bactérias (ALMEIDA et

al., 2012; CARBALLAR-LEJARAZU et al., 2008). Já foi relatado alta expressão de PAMs nos escorpiões *Vaejovis mexicanus* (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2015), *Lychas mucronatus* (RUIMING et al., 2010), *Chaerilus tricoatus* (HE et al., 2013) e *T. stigmurus* (ALMEIDA et al., 2012), que estão presentes em regiões com clima quente e úmido, o que pode levar à maior susceptibilidade a infecções microbianas. Além disso, o *T. stigmurus*, bem como o *T. serrulatus*, são frequentemente encontrados em canos de esgoto e ralos em busca de alimentação, que é baseada principalmente em baratas. Portanto, se faz necessário que esses animais apresentem defesas naturais, justificando assim, a alta expressão de PAMs na glândula de peçonha (ALMEIDA et al., 2012). Guo et al. em 2013 demonstraram que os AMPs TsAP-1 e TsAP-2 isolados de *T. serrulatus* apresentam ação antimicrobiana de amplo espectro e atividade contra células tumorais. Deste modo, os PAMs representam em uma classe de toxinas com potencial terapêutico.

Tabela 2. Identificação dos contigs da biblioteca de cDNA

Contig	Tamanho (pb)	Melhores hits	Espécie	Identificação em bancos de dados*	Valor de expectativa
1	1470	Hypothetical protein	<i>Tityus discrepans</i>	emb CAY61884.1	2×10^{-4}
2	1216	Ts1	<i>Tityus serrulatus</i>	sp P15226.2 SCX1_TITSE	0
3	980	NADH dehydrogenase subunit 1	<i>Centruroides limpidus</i>	ref YP_214900.1	1×10^{-67}
4	475	NADH dehydrogenase subunit 6	<i>Uroctonus mordax</i>	ref YP_001936655.1	3
5	425	Ts3	<i>Tityus serrulatus</i>	sp P01496.4 SCX1_TITSE	3×10^{-53}
6	179	Toxin Ce3	<i>Centruroides elegans</i>	sp P0C163.1 KAX2A_CENEL	7.1
7	706	Venom neuropeptide-3	<i>Mesobuthus eupeus</i>	gb ABR21072.1	1×10^{-91}
8	1323	Defensin-like protein	<i>Mesobuthus gibbosus</i>	gb AHZ63116.1	3.7
9	463	Ts2	<i>Tityus serrulatus</i>	sp P68410.1 SCX2_TITSE	1×10^{-40}
10	1197	Hypothetical secreted protein	<i>Hottentotta judaicus</i>	gb ADY39540.1	0.057
11	476	Ts8	<i>Tityus serrulatus</i>	sp P69940.2 KBX1_TITSE	1×10^{-59}
12	277	Metalloserrulase 8	<i>Tityus serrulatus</i>	gb KM115023.2	7×10^{-60}
13	520	Cysteine-rich peptide clone 2	<i>Tityus costatus</i>	sp Q5G8B7.1 CYSPE_TITCO	1×10^{-04}
14	409	Hypothetical protein	<i>Tityus discrepans</i>	emb CAY61884.1	8×10^{-10}
15	262	Hypothetical secreted protein	<i>Hottentotta judaicus</i>	gb ADY39514.1	3×10^{-11}
16	564	Ts6	<i>Tityus serrulatus</i>	sp P59936.2 KA121_TITSE	3×10^{-24}
17	488	Ts16	<i>Tityus serrulatus</i>	sp P86271.1 KA20_TITSE	1×10^{-09}
18	456	Ts16 (K4R)	<i>Tityus serrulatus</i>	sp P86271.1 KA20_TITSE	8×10^{-16}
19	469	Putative TIA1 protein	<i>Hottentotta judaicus</i>	gb ADY39600.1	1×10^{-07}
20	1322	Hypothetical protein	<i>Tityus discrepans</i>	emb CAY61861.1	2×10^{-33}
21	411	Cysteine-rich peptide clone 2	<i>Tityus costatus</i>	sp Q5G8B7.1 CYSPE_TITCO	7×10^{-25}
22	1352	Bradykinin-potentiating pep. BmK3	<i>Mesobuthus martensii</i>	sp Q9Y0X4.1 BPK3_MESMA	1×10^{-20}
23	494	Ts7	<i>Tityus serrulatus</i>	sp P46114.1 KAX41_TITSE	6×10^{-20}
24	274	Cathepsin F-like cysteine peptidase	<i>Tityus serrulatus</i>	emb CDJ26737.1	0.078
25	1169	Hypotensin-1 - Ts14	<i>Tityus serrulatus</i>	sp P84189.1 HYT13_TITSE	1×10^{-06}
26	1497	Ts19	<i>Tityus serrulatus</i>	sp P86822.2 KBX2_TITSE	3×10^{-26}
27	1477	Hypotensin-1 - Ts14	<i>Tityus serrulatus</i>	sp P84189.1 HYT13_TITSE	7×10^{-10}
28	1226	Clone 9 anionic peptide precursor	<i>Tityus costatus</i>	gb AY740691.1	1×10^{-151}
29	1200	mRNA for AP2 precursor	<i>Tityus serrulatus</i>	emb HF677517.1	1×10^{-166}
30	1590	Hypothetical protein	<i>Tityus discrepans</i>	emb CAY61884.1	8×10^{-08}
31	1176	Antimicrobial peptide meucin-18-1	<i>Mesobuthus eupeus</i>	gb ADT89761.1	4×10^{-23}
32	1727	Ts15	<i>Tityus serrulatus</i>	sp P86270.1 KA211_TITSE	9.6
33	2021	RP27 16S ribosomal RNA gene	<i>Tityus serrulatus</i>	gb AY586780.1	2×10^{-159}
34	1436	mRNA for AP1 precursor	<i>Tityus serrulatus</i>	emb HF677516.1	1×10^{-156}

O contig 7 apresentou similaridade com as toxinas *Venom neuropeptide-3* (gb|ABR21072.1) e *venom neuropeptide-2* (gb|ABR21059.1) do escorpião *Mesobuthus eupeus* e com a toxina *orcokinin* (gb|ADY62664.1) de *Hottentotta judaicus* com valores de expectância de 1×10^{-91} , 2×10^{-85} e 3×10^{-91} , respectivamente (Fig. 13). Essa toxina foi relatada somente nessas duas espécies de escorpiões, porém uma análise proteômica realizada pelo nosso grupo de pesquisa (dados não publicados) identificou esse componente na peçonha de *T. serrulatus*. Portanto é a primeira vez que esse componente é identificado nos escorpiões do gênero *Tityus*.

Figura 13. Alinhamento do contig 7 com as sequências referentes às toxinas *Venom neuropeptide-3* (gb|ABR21072.1) e *venom neuropeptide-2* (gb|ABR21059.1) do escorpião *Mesobuthus eupeus* e à toxina *orcokinin* (gb|ADY62664.1) de *Hottentotta judaicus*. As caixas pretas representam os aminoácidos conservados. Os resíduos em preto são conservados em pelo menos duas sequências, enquanto resíduos não conservados são representados em cinza. Os domínios NFDEIDR estão representados pela seta. O alinhamento foi realizado utilizando o programa MultAlin (CORPET, 1988). Valores de identidade foram calculados em relação ao contig 7 pelo programa Clustal W.

O peptídeo orcokinin (ORK) foi identificado pela primeira vez por Stangier et al. em 1992 no sistema nervoso do lagostim *Orconectes limosus*. Stangier et al. (1992) demonstraram que esse peptídeo possui ação miotrópica, principalmente no intestino grosso, aumentando tanto em frequência quanto em amplitude as contrações musculares

espontâneas. Já foi relatada a presença desse peptídeo em outros artrópodes (STERKEL et al., 2012; PASCUAL et al., 2004), porém pouco se sabe sobre o seu papel na peçonha. Christie, em 2015, relatou a presença de ORK na aranha *Latrodectus hesperus* e descreveu a presença do domínio NFDEIDR– em sua sequência. Os autores relatam que esse componente pode sofrer processamento pós-traducional e ser clivado em peptídeos menores, além de ser um possível preprohormônio (CHRISTIE, 2015; CHRISTIE; CHI, 2015).

Adicionalmente, outro contig que merece ser destacado é o contig 18 que apresentou valor de expectância de 9×10^{-16} com a Ts16 (P86271) de *T. serrulatus*. Esse contig apresenta uma substituição da lisina (K) para arginina (R) na quarta posição e o alinhamento mostrou 96,55% de identidade entre as sequências (Fig. 14). Essa substituição é conservativa, uma vez que os resíduos de aminoácidos pertencem a mesma classe, são carregados positivamente. A toxina Ts16 foi depositada por Bordon et al. em 2009 e foi classificada como uma α -KTx, com base em ensaios de eletrofisiologia. Em 2012, Saucedo et al. produziram a sua forma recombinante em *E. coli* e a mesma mostrou atividade similar à da toxina nativa. Essa isoforma da Ts16 contendo R na posição 4 foi encontrada na peçonha pelo nosso grupo (dados não publicados), o que permitirá a comparação da sua forma nativa com a recombinante quanto a estrutura e função em canais. Essa toxina, denominada de Ts16.1, foi depositada em bancos de dados.

	1	10	20	Id (%)
sp P86271.1	GCMKE	Y CAGQCRGKVSQDY	CLKHCKCIPR..	
Contig18	MKA EAGCMRE	Y CAGQCRGKVSQDY	CLKHCKCIPRFI	96,55

Figura 14. Alinhamento do contig 18 com a toxina Ts16 (P86271) *T. serrulatus*. As sequências apresentaram 96,55% de identidade. O alinhamento foi realizado utilizando o programa MultAlin (CORPET, 1988). Valores de identidade foram calculados em relação ao contig 7 pelo programa Clustal W.

Dentre as neurotoxinas de *T. serrulatus* mais estudadas, foram encontrados os singlets representantes às toxinas com ação em canais para sódio do tipo Nav, como Ts1 (β -NaScTx) e Ts2, Ts3, Ts5 (α -NaScTx). Quanto às toxinas com ação em canais para potássio do tipo Kv, os seguintes singlets foram identificados: Ts6, Ts7, Ts15 e Ts16 classificadas como α -KTx, Ts8 e Ts19 como β -KTx. Outras toxinas como

metaloproteinases, hipotensinas e PAMs já descritos na literatura também foram identificados. Os dados obtidos nesse transcriptoma serão depositados em bancos de dados.

4.1.3.2. Anotação funcional por GO e KEGG

Um total de 26% ESTs foram categorizados como “Não Toxinas”. Essa categoria inclui principalmente proteínas celulares responsáveis pelo metabolismo e manutenção do próprio animal. Os ESTs obtidos foram analisados por “Gene Ontology” (GO), que consiste em uma ferramenta de bioinformática que busca unificar a representação dos genes e os seus produtos gênicos, criando um vocabulário controlado e padronizando de maneira a ser aplicado a todos organismos eucariotos para o conhecimento dos genes e seus produtos (GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2000).

Com o objetivo de ampliar o acesso a esse recurso, os criadores do GO, desenvolveram o AmiGO, uma ferramenta online que permite a busca, análise, visualização e download de ontologias e realização de associação com as anotações de produtos dos genes analisados. A ontologia abrange 3 domínios: **(1)** componente celular (parte da célula ou seu ambiente extracelular), **(2)** função molecular (atividades elementares de um produto gênico a nível molecular, como ligação ou catálise) e **(3)** processo biológico (operação ou séries de eventos moleculares com início e fim definidos, pertinentes ao funcionamento das unidades vivas integradas) (THOMAS et al., 2007; DE ALVARENGA et al., 2012). Assim no presente estudo, foi possível identificar que os transcritos referentes a compostos celulares estavam localizados na região extracelular, relacionados à resposta imunológica (contra fungos e bactérias) e células de defesa e à ação inibitória de canais iônicos para sódio e potássio (Fig. 15).

As análises funcionais do transcriptoma da glândula de peçonha sugerem a relevância funcional e especificidade da expressão gênica. As anotações de ontologias demonstram que a glândula apresenta alta expressão de componentes na região extracelular. De acordo com o banco de dados do GO, a região extracelular corresponde aos componentes localizados na parte externa da célula e que não estão aderidos à membrana celular, de maneira que produtos gênicos de um organismo multicelular que são secretados a partir da célula no fluido intersticial ou no sangue podem ser agrupados nessa categoria. Portanto, essa categoria abrange toda a expressão de componentes como metabólitos, enzimas, fatores de crescimento, receptores, enzimas, entre outros.

O segundo grupo de componentes mais encontrados pelo GO corresponde a transcritos envolvidos na defesa imunológica. Esse fato corrobora com o grande número de ESTs referentes às toxinas com possível ação antimicrobiana encontrado no presente trabalho. Como já foi discutido, é necessário que esses animais apresentem defesas naturais devido ao habitat em que se encontram e o tipo de alimentação que possuem (ALMEIDA et al., 2012).

Figure 15. Distribuição dos EST de acordo com o GO para função molecular. Para ESTs classificados com componente celular dentro da classe “Não-Toxinas” foi realizada a busca contra os bancos de dados BLAST e Swissprot. Para predição das proteínas foi realizada a anotação ontológica utilizando o programa AmiGO 1.8.

O terceiro grupo de componentes mais expressos está relacionado com a ação inibitória de canais iônicos, o que pode proteger as células da glândula de peçonha contra a ação das próprias toxinas (HE et al., 2013).

Após a realização do GO, essas informações foram submetidas à análise por via KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), que é outra ferramenta de bioinformática que associa o genoma, via metabólica e componente biológica. Os resultados obtidos a partir de técnicas ômicas podem ser submetidos a essa análise para interpretação biológica em relação a função sistêmica (OGATA, et al., 1999). O resultado da análise por via KEGG do presente transcriptoma é representado na figura 16. Esta análise está relacionada com o ambiente funcional da glândula de peçonha.

Figura 16. Proporção relativa de cada categoria baseada no banco de dados da via KEGG. A análise foi realizada com os ESTs referentes a componentes celulares utilizando BLASTx e Uniprot como bancos de dados. As categorias mais frequentes estão representadas pela seta.

Neste estudo pode-se observar que a maioria dos ESTs identificados como componentes celulares estão envolvidos com a via de fosforilação oxidativa e apresentam similaridade com componentes do ribossomo. A via de fosforilação

oxidativa corresponde à maior fonte de energia para a célula nos eucariotos, na forma de ATP (SMITH et al., 2011). Além dessa via, o transcriptoma apresentou várias proteínas ribossomais, que contribuem para o evento da síntese proteica, uma vez que um grande número de proteínas dessa categoria é necessário para a síntese de toxinas (ZHANG et al., 2006).

Atualmente já foram realizados os transcriptomas de diversas espécies de escorpião, como pode ser observado na tabela 3. Nessa tabela é apresentada a descrição de todos os transcriptomas já realizados, bem como o estímulo prévio para a retirada da glândula, a metodologia abordada, a cobertura de clones/ESTs ou *reads* (para sequenciamentos de nova geração – NGS) e o rendimento referente aos transcritos que codificam toxinas. Todos esses fatores podem refletir na composição de toxinas da peçonha. A abordagem mais empregada é o método tradicional do sequenciamento por eletroforese em capilar, desenvolvido por Sanger et al. (1977).

Embora os sequenciadores de nova geração apresentem uma alternativa rápida e precisa na construção de bibliotecas de cDNA em relação ao método de Sanger, alguns fatores devem ser considerados no momento da escolha do método a ser utilizado (SHENDURE; JI, 2008). Os sequenciadores de nova geração necessitam que a amostra de RNA de interesse seja fragmentada em tamanhos menores para permitir a sua leitura, gerando uma gama de sequências que variam de comprimento de 30 a 400 pb. Essa abordagem é ideal quando o objetivo do estudo é analisar a expressão e rearranjo de um gene específico, categorizar evolutivamente o organismo de estudo ou realizar o levantamento de todo arsenal gênico do tecido ou célula estudada.

Tabela 3. Transcriptomas de diferentes espécies de escorpiões realizados até o momento.

Família	Espécie	Ref	Estímulo	Método	ESTs ou reads	Proporção de toxinas
Buthidae	<i>Hottentotta conspersus</i>	A	ND	Sanger	98	36%
	<i>Hottentotta judaicus</i>	B	Nenhum	Sanger	537	24%
	<i>Mesobuthus eupeus</i>	C	ND	Sanger	1911	13,1%
	<i>Mesobuthus gibbosus</i>	D	2 dias	Sanger	177	25%
	<i>Parabuthus stridulus</i>	E	ND	Sanger	111	56%
	<i>Centuroides noxius</i>	F	Ambos	NGS	3.008.049	1%
	<i>Lycas mucronatus</i>	G	2 dias	Sanger	738	56%
	<i>Tityus stigmurus</i>	H	Nenhum	Sanger	540	41%
	<i>Tityus discrepans</i>	I	5 dias	Sanger	112	50%
	<i>Tityus costatus Karsch</i>	J	ND	Sanger	Busca específica*	
	<i>Tityus obscurus</i>	L	5 dias	Sanger	Busca específica*	
	<i>Tityus pachyurus</i>	L	5 dias	Sanger	Busca específica*	
	<i>Tityus bahiensis</i>	M	2 dias	NGS	116.027	7,4 %
	<i>Tityus serrulatus</i>	N	2 dias	Sanger	1629	37%
	<i>Tityus serrulatus</i>	O	5 dias	Sanger	558	61,8%
Scorpionidae	<i>Heterometrus petersii</i>	P	2 dias	Sanger	486	70%**
	<i>Pandinus cavimanus</i>	Q	ND	Sanger	250	24%
	<i>Pandinus imperator</i>	R	ND	NGS	428,844	ND
	<i>S. maurus palmatus</i>	S	5 dias	Sanger	102	46%
	<i>Urodacus yaschenkoi</i>	T	Nenhum	Sanger	120	20,4%
Chaerilidae	<i>Chaerilus tricostatus</i>	T	2 dias	Sanger	884	46%
	<i>Chaerilus tryznai</i>	U	2 dias	Sanger	650	40%
Caraboctonidae	<i>Hadrurus gertschi</i>	V	5 dias	Sanger	147	31%
Euscorpiidae	<i>Scorpiops jendeki</i>	X	2 dias	Sanger	871	57,9%
Hemiscorpiidae	<i>Opisthacanthus cayaporum</i>	Z	4 dias	Sanger	118	36%
Vaejovidae	<i>Vaejovis punctatus</i>	W	ND	Sanger	28	33,7%
	<i>Vaejovis subcristatus</i>	W	ND	Sanger	24	17,3%
	<i>Vaejovis mexicanus</i>	W	ND	Sanger	197	72,1%
	<i>Vaejovis intrepidus</i>	W	ND	Sanger	55	33%

*Busca por uma classe de toxina, utilizando oligonucleotídeos específicos; **Relata apenas a proporção de transcritos referentes à proteínas secretórias e não toxinas; ND = não determinado; NGS = *Next-Generation Sequencing*; REF = Referências; A = Mille et al., 2015; B = Morgenstern et al., 2011; C = Kuzmenkov et al., 2015; D = Diego-García et al., 2014; E = Mille et al., 2014; F = Rendón-Anaya et al., 2012; G = Ruiming et al., 2010; H = Almeida et al., 2012; I = D'Suze et al., 2009; J = Diego-García et al., 2005; L = Guerrero-Vargas et al., 2012; M = de Oliveira et al., 2015; N = Alvarenga et al., 2012; O = Amorim et al., 2015 (tese); P = Ma et al., 2010; Q = Diego-Garcia et al., 2012; R = Roeding et al., 2009; S = Abdel-Rahman et al., 2013; T = Luna-Ramírez et al., 2013; U = He et al., 2013; V = Schwartz et al., 2007; X = Ma et al., 2009; Z = Silva et al., 2009; W = Quintero-Hernández et al., 2015.

Diferentemente do NGS, o método de Sanger permite a leitura de sequências contendo até 750 pb sem a necessidade da fragmentação do RNA a ser utilizado, o que permite a obtenção de transcritos contendo sequências completas de toxinas, incluindo o peptídeo sinal. O presente transcriptoma foi realizado com a metodologia de Sanger e obteve 61,8% dos transcritos relacionados a toxinas, sendo que esse rendimento foi superior ao relatado em outras bibliotecas de cDNA (Tabela 3). A abordagem por Sanger parece apresentar uma melhor cobertura dos transcritos que codificam toxinas, diferentemente dos NGS (Tab. 3). Oliveira et al. (2015) obteve 7,4% de transcritos referentes a toxinas em um transcriptoma de glândula de peçonha realizado por NGS com mais de 100 mil *reads*. Nesse trabalho, é relatada a possibilidade de as sequências curtas terem sido descartadas durante a construção da biblioteca, uma vez que o protocolo não é otimizado para esse tipo de tecido, que é rico em mRNA curtos.

Assim, quando o objetivo é identificar novos componentes ou toxinas que apresentam baixo rendimento visando uma produção heteróloga das mesmas, como ocorre no caso das peçonhas e venenos animais, o método de Sanger é a melhor escolha. Esse tipo de abordagem não necessita a fragmentação prévia do mRNA, permitindo a sua posterior clonagem para vetores de expressão e a produção heteróloga de toxinas de interesse.

O transcriptoma da glândula não constitui a representação fiel do proteoma da peçonha animal. Um exemplo dessa observação é o trabalho de He et al. (2013) no qual é realizado o transcriptoma de várias espécies de escorpião do gênero *Chaerilidae* e é encontrado na glândula de peçonha uma alta expressão de genes codificantes de PAMs. Porém, sabe-se que a peçonha de escorpião é majoritariamente constituída de neurotoxinas, enquanto os PAMs são raramente isolados.

Para explicar essas variações, Durban et al. (2013) realizaram o transcriptoma e proteoma integrados de *Crotalus sinus sinus* e relataram que esse fato se deve à presença de micro RNA (miRNA). Os miRNAs ligam-se ao complexo RISC (complexo de indução do silenciamento de RNA) e direcionam a clivagem de mRNAs com os quais têm complementaridade. Os miRNAs podem também se ligar ao mRNA impedindo a sua tradução pelo ribossomo, ou ainda degradar o mRNA alvo ao qual se liga por deadenilação (retirada da cauda poli-A), atuando desta forma na repressão da tradução proteica.

4.1.4. Análise do clone da hialuronidase obtido a partir do transcriptoma da glândula de peçonha do *T. serrulatus*

Com a construção e análise da biblioteca de cDNA foi obtido um clone (n° 556), que corresponde a um fragmento da hialuronidase (Fig. 17). A baixa expressão do transcrito em relação às outras classes de toxinas é observada também na peçonha (WIEZEL et al., 2015; BORDON et al., 2012). A hialuronidase nativa representa aproximadamente 0,4% da peçonha como já foi relatado por Pessini et al. (2001), ou seja, uma proporção extremamente baixa quando purificado por métodos cromatográficos. Quanto ao transcriptoma de *T. serrulatus* realizado por Alvarenga et al. (2012) foram identificados apenas dois clones da hialuronidase na glândula da peçonha.

Clone 556	
gggatgcctggcaggtcgactctagaggatcccaagcagtggtatcaacgcagagtacag	
G M P G R S T L E D P K Q W Y Q R R V Q	
ggggtgctgaataccaatcggtttagccagtttaatttgcaaaggaagaggaaactgtatt	
G V L N T N R C S Q L I C K G R G N C I	
tggccggcggaaccattctcatcgtggaaatatatttggaaccctaaaatgcctgtattc	
W P A E P F S S W K Y L L D P K M P V F	
aaacccatgaaaattatttgcaagtgtaaacattacctgggacggttattgtcaaattcca	
K P M K I I C K C K H Y L G R Y C Q I P	
aaataa	
K -	

Figura 17. Sequência de DNA do clone 556. Em negrito, a região codificante correspondente à região C-terminal da hialuronidase e os seus códons. A região codificante está em preto seguido dos resíduos de aminoácidos preditos em negrito. A sequência de aminoácidos foi predita pelo ExPASy Translate.

O clone foi analisado contra bancos de dados (BLASTX) e corresponde a região C-terminal da hialuronidase, com *e-values* de 5×10^{-34} e 7×10^{-29} , respectivamente, para as sequências TsHyal-2 (gb|AHF72516.1|) e TsHyal-1 (gb|AHF72517.1) de *T. serrulatus*. O clone 556 apresentou 76,54% de identidade com a TsHyal-2 e 65,43% com a TsHyal-1, podendo ser uma nova isoforma da enzima (Fig. 18). As sequências das

hialuronidases 1 e 2 foram depositadas em 2014 por Horta et al. e foram obtidas no transcriptoma de *T. serrulatus* realizado em 2012 por Alvarenga et al. (2012).

Figura 18. Alinhamento do clone 556 e da região C-terminal da TsHyal-1 (gb|AHF72517.1) e TsHyal-2 (gb|AHF72516.1). As caixas pretas representam os aminoácidos conservados. Os resíduos em preto são conservados em pelo menos duas sequências, enquanto resíduos não conservados são representados em cinza. O alinhamento foi realizado utilizando o programa MultAlin (CORPET, 1988). Valores de identidade foram calculados em relação ao contig 7 pelo programa Clustal W.

De acordo com o sequenciamento de DNA, pode-se observar que o clone obtido da hialuronidase corresponde à região C-terminal e possivelmente a uma nova isoforma da enzima. Fragmentos de cDNA codificante da hialuronidase em análises de transcriptoma já foram observados previamente em outros trabalhos. Harrison et al. (2007) obtiveram dois clones dessa enzima no transcriptoma da glândula de peçonha da serpente *Echis ocellatus*. Os autores especulam sobre a possibilidade de as mesmas corresponderem a sequências vestigiais do desenvolvimento evolutivo do gene que codifica a enzima. Os autores concluíram que as sequências truncadas de nucleotídeos da hialuronidase podem representar exemplos de *splicing* alternativo, no qual há o rearranjo de íntrons e éxons do gene durante a transcrição do RNA. Esse rearranjo poderia gerar uma variação na sequência de RNA e, consequentemente, sequências truncadas ou até mesmo isoformas da enzima.

Em relação às sequências truncadas de hialuronidases de animais peçonhentos, as enzimas do escorpião *Mesobuthus martensii* (GU130249) e da aranha *Brachypelma vagans* (JX235338) apresentam a região N-terminal truncada enquanto a sequência da aranha *Loxosceles laeta* apresenta o C-terminal truncado (CLEMENT et al., 2012).

4.2. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA HIALURONIDASE RECOMBINANTE

4.2.1. Desenho do gene sintético da hialuronidase em vetor de expressão da *P. pastoris*

Diante dos resultados obtidos, em que o clone da hialuronidase não corresponde à sequência completa da enzima, e devido ao depósito da sequência da hialuronidase de *T. serrulatus* em bancos de dados por Horta et al. (2014), optamos pela síntese do vetor de expressão pela empresa GeneScript Corporation (EUA). Portanto, foi realizada a síntese da sequência da hialuronidase isoforma 1 (gb|AHF72517.1) de *T. serrulatus* (TsHyal-1) no vetor pPICZ α A da *Pichia pastoris*, originando o plasmídeo recombinante pPICZ α A-TsHyal1.

O vetor de expressão de escolha foi o pPICZ α A (Invitrogen), por apresentar diversas vantagens, dentre elas, a presença de um peptídeo sinal que consiste no fator de acoplamento alfa (α MF – α mating factor) de *Saccharomyces cerevisiae*, que permite o direcionamento da proteína recombinante para a via secretória da levedura, facilitando assim, a sua purificação. Além disso, o vetor apresenta o gene de resistência à zeocina, múltiplos sítios de clonagem e apresenta como promotor o gene AOX1.

Para a síntese, a sequência de interesse foi inserida entre os sítios de clonagem das enzimas de restrição *XhoI* e *Sall* (Fig. 19). Essa região foi escolhida de maneira a permitir que a proteína recombinante fosse expressa com o N-terminal nativo através da inclusão do sítio de clivagem da kexina 2 (Kex2), localizado próximo ao sítio de *XhoI*. Durante a expressão heteróloga, endoproteases da *P. pastoris* clivam o sítio de Kex2 no complexo de Golgi, o que leva a levedura a expressar a proteína recombinante na forma madura, sem peptídeo sinal, para o meio de cultura (YANG et al., 2013). A escolha da clonagem por *Sall* leva à remoção dos sítios adicionais de clonagem por outras enzimas de restrição e também da sequência do vetor referente ao epítipo *c-myc* e a cauda de histidina. O epítipo *c-myc* localiza-se na região C-terminal da proteína recombinante e geralmente é utilizado para detecção da mesma por Western Blot. O gene sintético foi desenhado de maneira que a cauda de histidina (CATCATCATCATCATCAT) não fosse expressa no C-terminal da proteína. A cauda de histidina auxilia tanto na identificação da proteína recombinante por Western Blot, quanto na sua purificação utilizando cromatografia por afinidade com resina de níquel. Todas essas alterações foram realizadas para que a proteína recombinante não fosse expressa com resíduos de

aminoácidos adicionais que poderiam interferir do enovelamento da proteína ou na sua atividade enzimática.

Figura 19. Sequência de nucleotídeos do plasmídeo recombinante pPICZαA contendo o inserto referente à sequência da TsHyal-1. O cDNA da TsHyal-1 foi sintetizado subjacente ao fator-α para proteínas secretadas, e apresenta um sítio de restrição para *XhoI* (em vermelho) e um sítio de reconhecimento da enzima *Kex2* (em azul). O gene foi inserido no vetor de forma que a proteína seja expressa sem o epítipo *myc* e cauda de poli-histidina na porção C-terminal, portanto, logo após ao códon de parada (identificado por três asteriscos) foi adicionado o sítio de restrição para a enzima *SalI* (em vermelho). A região do inserto que codifica a TsHyal-1 está representada em negrito e grifada. As regiões correspondentes ao anelamento dos oligonucleotídeos senso (5' AOX) e antisseno (3' AOX) da região AOX1 estão destacadas.

A escolha da TsHyal-1 de *T. serrulatus* foi determinada com base na análise do modelo tridimensional realizado por Horta et al. (2014) no qual compara a sequência/estrutura das isoformas da hialuronidase, TsHyal-1 e TsHyal-2 (Fig. 20). Ambas as sequências apresentam alguns sítios conservados para a atividade enzimática, como ácido aspártico (D) na posição 102 e ácido glutâmico (E) nas posições 104 e 244 (em verde). Esses resíduos atuam como doadores de prótons necessários para a catálise e mutações nesses aminoácidos resultam em perda de atividade (JEDRZEJAS; STERN, 2005). Os resíduos de arginina (R) nas posições 107 e 241 e a serina (S) na posição 298 (em vermelho), são importantes para a interação a enzima com o substrato. A presença de dois resíduos de R (107 e 241) conservados são responsáveis pelo direcionamento do substrato hialuronan para o sítio ativo por interações eletrostáticas. Entretanto a isoforma TsHyal-2 apresenta uma substituição da R para leucina (L) na posição 107 (seta rosa). Essa modificação pode alterar a ligação da enzima com o substrato.

As tirosinas (Y, em amarelo) e os triptofanos (W, em azul) atuam no posicionamento correto e na interação do substrato com o sítio ativo da enzima, interagindo com o grupo metil do N-acetil presente no hialuronan (identificado por círculo). Já o resíduo Y na posição 220 (identificado por um quadrado) se liga ao sítio de clivagem do substrato através de ligações de hidrogênio. Entretanto, a isoforma TsHyal-2 apresenta uma alteração nessa posição, no qual a Y foi substituída por uma histidina (H) (seta rosa). Essas alterações podem modificar a especificidade ao substrato, como foi discutido por Horta et al., 2014.

Além disso, a TsHyal-1 apresenta 5 possíveis sítios de N-glicosilação (em roxo), enquanto a TsHyal-2 apresenta somente 3 sítios. Já foi relatado que a presença da glicosilação influencia na atividade hialuronidásica (HOFINGER et al., 2007). Adicionalmente, as modificações na sequência da TsHyal-2 relatadas acima podem indicar que essa isoforma pode ser menos ativa e apresentar especificidade para o substrato alterada.

A hialuronidase descrita por Horta et al. (2014) possui 11 cisteínas (Fig. 20, asterisco azul) perfazendo 5 ligações dissulfeto, altamente conservadas entre as duas isoformas. Embora exista a presença de várias ligações dissulfeto, trabalhos realizados pelo nosso grupo demonstraram que a enzima nativa perde consideravelmente a atividade em pHs extremos e temperaturas abaixo de 30°C e acima de 50°C (PESSINI et al., 2001).

Portanto, com base nestas análises, optou-se pela expressão da hialuronidase TsHyal-1 de *T. serrulatus* em sistema heterólogo de *P. pastoris* e os resultados obtidos são apresentados a seguir.

Figura 20. Alinhamento das isoformas de hialuronidases de *T. serrulatus*. As sequências da TsHyal-1 (P85841) e TsHyal-2 (W0HFN9) apresentam regiões conservadas. Em verde, resíduos D e E que atuam como doadores de prótons necessários para a catálise. Em vermelho, R e S que direcionam o substrato para o sítio ativo da enzima. Em amarelo e azul, Y e W, respectivamente, responsáveis pelo posicionamento e interação do substrato com sítio ativo da enzima. Resíduos importantes na ligação no grupo N-acetil do substrato estão identificados por círculos, enquanto a Y (marcada com quadrado) se liga ao sítio de clivagem do substrato através de ligações de hidrogênio. As alterações da TsHyal-2 em aminoácidos que podem interferir com sua atividade estão identificadas pela seta rosa. Os possíveis sítios de glicosilação estão destacados em roxo e as cisteínas são indicadas por asteriscos azuis. O alinhamento foi realizado utilizando o programa MultAlin (CORPET, 1988). Fonte: Adaptado de Horta et al. (2014).

4.2.2. Transformação das células de *P. pastoris*

Para a transformação, o plasmídeo recombinante foi previamente linearizado com a enzima de restrição *PmeI* e transformado em células da linhagem KM71H de *P. pastoris*. O plasmídeo linearizado facilita a integração no genoma da *P. pastoris* criando cepas estáveis para expressão e gera um grande número de transformantes. A enzima *PmeI* reconhece a região 5'-GTTTAAAC-3' no meio do promotor AOX1 do plasmídeo. Portanto, plasmídeos linearizados com a *PmeI* integram preferencialmente na região promotora AOX1 (*arg4 aox1::ARG4*) do genoma da *P. pastoris* por recombinação homóloga, originando transformantes estáveis (Fig. 21) (VAN DEN BERG; MARUTHACHALAM, 2015, CREGG et al., 1985, 1987; HIGGINS & CREGG., 1998; LIN-CEREGHINO & CREGG, 2000).

Figura 21. Representação esquemática do plasmídeo recombinante no locus *aox1::ARG4* do genoma da *P. pastoris*. A inserção do plasmídeo linearizado com a *TsHyal-1* e o gene da resistência à *Zeocina* ocorre no locus *AOX1*.

Dentre as colônias obtidas, foram selecionadas 27 clones para a análise da PCR de colônia e confirmação da presença do inserto. Para tanto, foi utilizado o oligonucleotídeo senso para região 5' da sequência da hialuronidase (descrito no item 3.2.3.) e oligonucleotídeo antisenso para região 3' *AOX1* do plasmídeo pPICZαA. Das colônias analisadas, 10 foram positivas para a integração do vetor quando visualizadas

em gel de agarose 1% (Fig. 22), apresentando banda única de tamanho esperado. As colônias positivas foram selecionadas e utilizadas para a triagem de expressão da proteína recombinante.

Figura 22. Produtos da PCR das colônias de *P. pastoris* transformadas com o plasmídeo recombinante TsHyal-1. Gel em agarose 1% das 27 colônias selecionadas aleatoriamente foram submetidas à PCR de colônia. As colônias positivas selecionadas para triagem em expressão estão identificadas com a seta branca. MM, marcador molecular Gene Ruler 1Kb (*Fermentas*, EUA); 1 a 27, produtos de PCR das colônias selecionadas; Ct-, controle negativo.

Diversas linhagens de *P. pastoris* são bem caracterizadas geneticamente e funcionalmente. Dentre as cepas existentes, a escolhida para expressão foi a KM71H. A linhagem KM71H possui o fenótipo do tipo Mut^S (*metanol utilization slow*), ou seja, o gene AOX1 encontra-se corrompido, o que impossibilita a expressão da enzima álcool oxidase-1. Cepas denominadas Mut^S apresentam o gene da AOX1 mutado, porém o gene da AOX2 é selvagem. Esse perfil resulta em um fenótipo de crescimento lento em meio contendo metanol, diferentemente da cepa GS115, por exemplo, que é denominada Mut⁺ e Mut^S e pode apresentar os dois fenótipos. Assim, a expressão heteróloga na cepa KM71H não requer uma triagem do fenótipo Mut em meio mínimo contendo metanol, o que pode ser uma vantagem em questão da otimização do tempo. Embora uma linhagem possa expressar melhor a proteína recombinante que a outra, não há como prever qual será a melhor escolha para a proteína de interesse (*Pichia* Expression Kit, Invitrogen).

Além disso, a cepa KM71H apresenta uma mutação no gene que codifica a argininosuccinato liase (*arg4*) que previne que a cepa cresça na ausência de arginina. O

gene selvagem foi utilizado para romper o gene AOX1 (*aox1::ARG4*), criando a cepa Mut^S Arg⁻. Esse locus também é utilizado para a integração do plasmídeo pPICZαA linearizado na célula hospedeira por recombinação homóloga (EasySelect™ *Pichia* Expression Kit, Invitrogen).

4.2.3. Avaliação das condições de expressão da proteína recombinante em placa

As dez colônias positivas identificadas por PCR de colônia foram submetidas a uma triagem de expressão em pequena escala, seguida da avaliação do seu perfil eletroforético e determinação da atividade hialuronidásica em placa. Portanto, foi realizada a expressão em placa contendo 2 mL de meio, em duas etapas: a geração da biomassa, para crescimento das células, seguida da fase de indução, com a alimentação diária de metanol para a expressão da proteína recombinante. Para a avaliação da atividade da hialuronidase, foram coletadas alíquotas do sobrenadante da expressão após 96 h e 144 h do início da fase de indução. Adicionalmente, o final da indução (144 h) foi analisado por SDS-PAGE a 13,5% corado com prata.

Das dez colônias analisadas, todas expressaram a TsHyal-1 recombinante (rTsHyal-1) na sua forma ativa e a secretaram no meio de cultura na forma solúvel. Na SDS-PAGE, apresentada na figura 23A, pode ser observada uma banda de aproximadamente 45 kDa, que provavelmente corresponde à hialuronidase, visto que a massa teórica predita pelo ProtParam (Expasy) para TsHyal-1 é 44,618 kDa. Apesar de todas colônias expressarem a hialuronidase, a colônia de número 19 foi a que apresentou maior atividade de hidrólise sobre hialuronan em placa e por isso foi selecionada para os passos subsequentes de expressão (Fig. 23B).

Figura 23. Triagem da expressão em pequena escala para seleção da colônia que apresenta a maior taxa de expressão da rTsHyal-1. (A) SDS-PAGE a 13,5% em condições redutoras dos sobrenadantes das colônias analisadas. **(B)** Avaliação qualitativa da atividade hialuronidásica em placa e determinação do halo de hidrólise do substrato. PM: Padrão massa molecular; Pts: peçonha de *Tityus serrulatus*; C-: controle negativo.

A colônia 19 foi selecionada para triagem das melhores condições da expressão. Para tanto a mesma foi submetida a uma nova triagem em placa contendo 2 mL de meio BMGY, pH 6,0 e incubada por 48 h a 30°C e 190 rpm. Em seguida, o meio de cultura

foi substituído por diferentes meios para avaliar as condições de expressão da proteína recombinante, sendo esses: BMMY pH 4,0, BMMY pH 6,0, BMMY pH 7,0, BMM pH 4,0, BMM pH 6,0, BMM pH 7,0 e MM não tamponado. A indução da expressão foi mantida com alimentação diária de metanol a uma concentração final de 0,75% e foram coletadas alíquotas (200 μ L) em 96 h, 120 h e 144 h após o início da indução. As alíquotas foram submetidas à avaliação da atividade da hialuronidase e ao final da expressão (144 h) foi realizada uma eletroforese em SDS-PAGE a 10% corado com prata (Fig. 24).

Pode-se observar que a maior porcentagem de hidrólise do hialuronan foi obtida com a expressão em meio BMM, pH 7,0 após 96 h do início da indução (Fig. 24A). A eletroforese realizada ao final da indução da expressão apresenta uma banda de aproximadamente 45 kDa apenas nos meios BMMY, pH 6,0; BMMY, pH 7,0; BMM, pH 6,0 e BMM, pH 7,0 (Fig. 24B). Esses dados corroboram com os dados obtidos pelo ensaio de atividade, uma vez que os sobrenadantes dos meios BMMY, pH 4,0; BMM, pH 4,0 e MM não apresentaram atividade hialuronidásica ou banda com massa esperada do gel. Além disso, o meio BMM, pH 6,0 ou pH 7,0 apresentaram menos contaminantes, principalmente de alta massa, como pode ser observado na figura 24B.

Figura 24. Triagem das melhores condições de expressão da hialuronidase pela colônia 19. (A) Atividade hialuronidásica por turbidimetria utilizando 10 μ L do sobrenadante do meio de expressão. **(B)** Eletroforese em SDS-PAGE 10% dos sobrenadantes dos diferentes meios de expressão no final da indução (144 h). **PM:** Padrão de massa molecular; **poço 1:** meio BMMY, pH 4,0; **poço 2:** BMMY, pH 6,0; **poço 3:** BMMY, pH 7,0; **poço 4:** BMM, pH 4,0; **poço 5:** BMM, pH 6,0; **poço 7:** MM. A banda correspondente a rTsHyal-1 é indicada pela seta. **C-:** controle negativo

De maneira geral a expressão é caracterizada por duas etapas principais, denominadas geração de biomassa e fase de indução. Durante a etapa de geração de biomassa, o glicerol presente no meio BMGY é utilizado como fonte de carbono, o que leva ao crescimento rápido das células. Já na fase de indução, o metanol atua como fonte de carbono e a sua suplementação diária é importante para produção da proteína recombinante (AIZEMBERG et al., 2011; CHOI; PARK et al. 2006; LOOSER et al., 2015, TERRAZAS et al., 2014).

Diversas estratégias para a otimização da expressão, ou *design de bioprocessamento*, têm sido propostas com o objetivo de maximizar a produção da proteína recombinante. O design de bioprocessamento tem como objetivo identificar as condições ótimas para o crescimento da biomassa e a produção da proteína recombinante, evitando e/ou minimizando a sua proteólise. Dentre os fatores que podem ser modificados com esse objetivo, têm-se o pH, temperatura, oxigênio e suplementação de nutrientes (LOOSER et al., 2015).

As células de *P. pastoris* apresentam a capacidade de sobreviver e crescer em uma faixa ampla de pH (3,0 a 7,0). Essa variação de pH não afeta significativamente o crescimento das células e permite o ajuste para o valor ótimo para expressão da proteína de interesse e não para as proteases que possam ser expressas durante o processo, aumentando assim o rendimento da proteína recombinante (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Já foi descrito que a proteína bovina humana recombinante foi expressa em pH 6,0, enquanto o fator de crescimento insulina-símile apresentou melhor rendimento em pH 3,0 (BRIERLEY et al., 1994). Quanto às toxinas animais que foram expressas em *P. pastoris*, pode-se exemplificar a serinoprotease de *Crotalus durissus collilineatus* expressa em pH 7,0 (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2015) e um inibidor de fosfolipase A₂ de *Bothrops alternatus* produzida em pH 6,0 (SANTOS-FILHO, et al. 2014). No presente trabalho a rTsHyal-1 apresentou maior atividade hialuronidásica em pH 7,0.

Outro fator que pode influenciar a expressão heteróloga é a suplementação de aminoácidos no meio de cultura, como pela adição de peptona, possivelmente por competirem com substratos de proteases e inibirem a indução de proteases causada pela limitação de nitrogênio (SREEKRISHNA et al., 1997; MACAULEY-PATRICK et al., 2005). A adição de peptona e extrato de levedura no meio de cultura (BMMY) influenciou a expressão da rTsHyal-1. Além disso, essa suplementação levou à produção de um maior número de contaminantes, principalmente de alta massa molecular, além de resultar na expressão da enzima com atividade hialuronidásica

reduzida, quando comparada ao meio sem suplementação (BMM). Esses dados corroboram a expressão da hialuronidase (Hya) de abelha em meio BMM no qual apresentou alto rendimento como foi relatado por Reitinger et al. (2008).

Além desses fatores, a redução da temperatura na fase de indução também pode influenciar no rendimento da proteína recombinante. A expressão em altas temperaturas pode afetar a estabilidade da proteína recombinante, alterar o seu enovelamento e solubilidade, bem como levar a produção de proteases (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Portanto, a expressão da rTsHyal-1 foi realizada a 26°C.

Embora existam diversos protocolos de cultivo disponíveis baseados em kits comerciais de expressão, a tendência atual é a busca de estratégias específicas para a produção da proteína recombinante de interesse de maneira a obter a proteína com rendimento apropriado, estrutura preservada e com alta atividade enzimática (LOOSER et al, 2015). Portanto, as condições escolhidas para a expressão da rTsHyal-1 em escala laboratorial foi meio mínimo sem adição de peptona e extrato de levedura (BMM) em pH 7,0, a 26°C.

4.2.4. Expressão da rTsHyal-1 em escala laboratorial

Diante dos resultados obtidos com a triagem, a rTsHyal-1 foi então expressa em escala laboratorial em meio BMM pH 7,0, para gerar proteína em quantidades suficientes para as caracterizações estruturais e funcionais. Foram coletadas alíquotas a cada 24 h do início da indução da expressão para quantificação proteica do sobrenadante, determinação da atividade hialuronidásica e SDS-PAGE 13,5% (Fig. 25).

Na figura 25, pode-se observar o aumento progressivo temporal da concentração proteica (Fig. 25 A e B), bem como a atividade hialuronidásica (Fig. 25 C e D), sendo que após 96 h do início têm-se o maior rendimento proteico e enzimático (Fig. 25 C e D). Portanto, a expressão foi finalizada com 96 h de indução e o material foi quantificado pelo método de Scopes. A expressão em escala laboratorial apresentou a concentração final de 0,266 mg/mL, totalizando em 25,27 mg de material expresso ao final da expressão. Esse material foi utilizado para realização dos ensaios seguintes, bem como para cromatografia para purificação da rTsHyal-1.

A primeira hialuronidase recombinante foi produzida em *E. coli* por Berry et al. em 1994. Os autores realizaram a expressão da enzima de *S. pneumoniae* na sua forma ativa e sem cauda de histidina, sendo purificada por uma coluna de troca catiônica

seguida de uma cromatografia por gel filtração. A expressão apresentou rendimento de 1 mg/L e os autores relataram a ação de proteases que clivaram a hialuronidase recombinante em fragmentos de 89 kDa e 94 kDa.

No ano seguinte, em 1995, Lu et al. realizaram a expressão heteróloga da primeira hialuronidase de peçonha animal, da vespa *D. maculata*, também em *E. coli*. A enzima foi purificada por coluna de afinidade ao níquel, seguida de fase reversa, porém a enzima recombinante perdeu a atividade devido ao reenovelamento e sofreu proteólise durante a sua expressão. Entretanto os autores conseguiram comprovar que a forma recombinante apresentava os mesmos epítomos da enzima nativa.

Figura 25. Análise temporal da expressão da rTsHyal-1 em meio BMM pH 7 até 96 h de indução. (A) SDS-PAGE 13,5% corado com prata. A proteína recombinante é indicada pela seta. PM: padrão de massa molecular; poço 1: tempo 0 h, poço 2: 24 h; poço 3: 48 h; poço 4: 72 h; poço 5: 96 h e poço 6: sobrenadante filtrado em membrana de poro 0,22 μ m. (B) Perfil da densitometria das bandas da SDS-PAGE comparando os componentes do meio do início (0 h) e do final (96 h) da indução da expressão da rTsHyal-1. Absorbância determinada em 550 nm, sendo o espectro criando pelo programa DenGo. (C) Rendimento proteico e atividade hialuronidásica de acordo com a fase de indução. (D) Atividade da hialuronidase durante a expressão (h). Branco: meio de cultura sem células.

De maneira geral, hialuronidases de diferentes organismos já foram expressas em diversos sistemas, como bactéria (JUSTO JACOMINI et al., 2014; MIRJAMALI et al., 2014; ABBASIAN et al., 2014, GMACHL AND KREIL, 1993; BERRY et al., 1994; LU et al., 1995; KING et al., 1996; SKOV et al., 2006; BAKKE et al., 2011; FERRER et al., 2013; SUCK et al., 2010), levedura (REITINGER et al., 2008; JIN et al., 2014), plantas (JUNG et al., 2010; LI et al., 2014), célula de inseto (SOLDATOVA et al., 1998; NG et al., 2005; HOFINGER et al., 2007; SOLDATOVA et al., 2007; CLEMENT et al., 2012) e de mamífero (FROST et al., 1997). Entretanto, até o presente momento apenas dois trabalhos relataram a expressão dessa enzima proveniente de animais em sistema de *P. pastoris*, sendo da peçonha de abelha (REITINGER et al., 2008) e da saliva da sanguessuga (JIN et al. 2014). Portanto, esse trabalho relata pela primeira vez a expressão heteróloga de uma hialuronidase de escorpião.

A determinação das melhores condições de expressão heteróloga da hialuronidase de *T. serrulatus* em *P. pastoris* permitirá o estudo aprofundado dessa enzima, na busca da elucidação estrutural bem como funcional. Nos últimos anos, as hialuronidases têm sido utilizadas para diferentes aplicações, dentre elas: para promover a penetração de substâncias ativas, na terapêutica de doenças induzidas pelo hialuronan, bem como na medicina estética. Existem diversas aplicações terapêuticas e biotecnológicas das hialuronidases em diversos campos (WOHLRAB et al., 2014). Entretanto se faz necessário o estudo aprofundado para elucidar as potenciais aplicações dessa enzima.

4.2.5. SDS-PAGE para zimografia e identificação de glicoproteínas

O meio dialisado foi concentrado três vezes e em seguida submetido à SDS-PAGE, à zimografia e à coloração com reagente de Shiff para identificação de glicoproteínas (Fig. 26).

É possível observar na figura 26 que a banda próxima a 45 kDa representa de fato a rTsHyal-1, comprovado pela presença de banda com atividade na zimografia (Fig. 26A). O material obtido na expressão formou agregado e as condições redutoras (tampão de amostra com β -mercaptoetanol e fervido por 5 min) não foram capazes de desfazer esse complexo. Pode-se observar que a rTsHyal-1 está agregada ao material expresso, uma vez que na zimografia indica a presença de banda de atividade na parte superior do gel (Fig. 26A). Além disso, a zimografia também apresenta uma banda de

atividade com massa aproximada de 60 kDa, essa banda também foi identificada com o reagente de Schiff para glicoproteínas. Essa banda pode representar a rTsHyal-1 com perfil de glicosilação diferente, como uma hiperglicosilação (Fig. 26B).

Figura 26. SDS-PAGE para realização da zimografia e identificação de glicoproteínas pelo reagente de Schiff. (A) Zimografia em SDS-PAGE (10%) com hialuronan para determinação da atividade hialuronidásica. **PM:** padrão de massa molecular; **poço 1:** meio de cultura em condições redutoras e desnaturantes; **poço 2:** meio de cultura em condições nativas; **poço 3:** meio de cultura em condições nativas. PM e poços 1 e 2 foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-350 e o poço 3 foi corado segundo Cevallos et al. (1992) com reagente Stains-all. (B) SDS-PAGE (10%). PM e poços 1 e 2 foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-350 e os poços 3 e 4 foram corados com reagente de Schiff para detecção de glicoproteínas. **PM:** padrão de massa molecular; **poço 1:** meio de cultura em condições redutoras e desnaturantes; **poço 2:** meio de cultura em condições nativas; **poço 3:** meio de cultura em condições redutoras e desnaturantes; **poço 4:** meio de cultura em condições nativas. Seta indica a presença da rTsHyal-1.

Diferentemente do sistema de expressão em bactérias, *P. pastoris* é capaz de realizar diversas modificações pós-traducionais que são realizadas por eucariotos superiores, como ligações dissulfeto, processamento de peptídeo sinal e, principalmente, N- e O-glicosilações. Em eucariotos, a adição de glicosilações na molécula ocorre no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi assim que a proteína é secretada. Para N-glicosilações, existem três classes de açúcares que podem ser adicionados na cadeia polipeptídica pela oligosacaril transferase. De maneira geral, o domínio de carboidrato apresenta um núcleo formado pela N-acetilglicosamina e manose e as classes variam de acordo com os açúcares encontrados na antena. As classes são: oligomanose (apenas resíduos de manose adicionais ao núcleo), complexo (qualquer resíduo exceto manose adicionados ao núcleo) e híbrido (uma mistura dos dois tipos anteriores). Entretanto, em

leveduras, como *Pichia*, a cadeia de oligossacarídeo adicionada à proteína é, na sua maioria, inalterada e consiste em resíduos de manose. Embora existam diferenças no tipo de N-glicano adicionados, o sítio para a inserção das N-glicosilações é o mesmo para organismos eucariotos (Asn-Xaa-Ser/Thr) (Fig. 27) (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

Pichia, como outras leveduras e fungos, adicionam O-oligossacarídeos a grupos hidroxil dos resíduos serina ou treonina das proteínas secretadas. Esses açúcares são constituídos apenas de manose (Fig. 27). Além disso, é possível que a proteína recombinante se torne glicosilada mesmo que a sua forma nativa não seja ou até que a *Pichia* não realize glicosilações nos mesmos resíduos observados na proteína nativa (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Já foi relatado que glucosamilase recombinante de *Aspergillus awamori* apresentou 20 kDa a mais que a proteína nativa, sendo que 10 kDa correspondem a N-glicosilações e o restante foi atribuído à O-glicosilações, constituindo aproximadamente 20-30 resíduos de manose (HEIMO et al., 1997). Embora a adição de O-glicosilações pela *P. pastoris* seja relatada, esse processo é menos compreendido quando comparado às N-glicosilações (PUXBAUM et al., 2015).

Figura 27. Representação do padrão de glicosilação realizado pela *P. pastoris*. A região do núcleo da glicosilação está representada por símbolos pretos cheios. Resíduos de manose que são frequentemente adicionados são representados por círculos em cinza, enquanto os círculos em branco, com borda cinza e linha pontilhada indicam a frequência decrescente em que ocorrem os respectivos resíduos nos glicanos. Fonte: Adaptado de Puxbaum et al., 2015.

Portanto, esses dados corroboram com os resultados obtidos na eletroforese corada com reagente de Schiff e na zimografia, nos quais foi possível identificar

diferentes populações da rTsHyal-1, possivelmente resultantes de variações na glicosilações.

4.2.6. Purificação da rTsHyal-1

A rTsHyal-1 foi expressa sem a cauda de histidina, portanto, foi padronizado um protocolo de purificação baseado na técnica cromatográfica de troca iônica. O material dialisado (15 mL) foi diluído duas vezes em água, totalizando o volume final de 30 mL e aplicado na coluna CMC-52 C10/40 (*GE Healthcare*, Reino Unido). A coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM a pH 6,0 e a eluição foi realizada com gradiente segmentado até 100% de acetato de sódio 1 M, pH 6,0 (tampão B), resultando em duas principais frações denominadas C1 e C2 (Fig. 28). A fração C2 apresentou 80% de hidrólise sobre o hialuronan. Essa fração foi concentrada e foi submetida a SDS-PAGE 10% (Fig. 29). A presença de banda próxima a 45 kDa e com atividade detectada na zimografia, confirmam a purificação da rTsHyal-1 com bom grau de pureza.

Figura 28. Perfil cromatográfico do fracionamento das proteínas presentes no meio de cultura em coluna CMC-52. A cromatografia foi realizada em sistema FPLC Äkta Purifier UPC10. O meio de cultura da expressão purificado em coluna CMC-52 com tampão acetato de sódio 50 mM pH 6 (tampão A). A eluição foi realizada com gradiente até 100% de acetato de sódio 1 M, pH 6 (tampão B), sob vazão de 0,5 mL/min, coletando 1 mL por tubo. A absorbância foi monitorada a 280 nm. A seta indica a fração que apresentou atividade da hialuronidase.

Figura 29. SDS-PAGE e zimografia com a fração C2 obtida da CMC-52. PM: padrão de massa molecular; **poço 1:** fração C2 em condições nativas corado de acordo com Cevallos et al. (1992) para detecção da atividade hialuronidásica; **poço 2:** fração C2 em condições redutoras (β -mercaptoetanol e fervido por 5 min).

A recuperação e o rendimento das frações com atividade hialuronidásica obtidas nessa etapa de purificação da enzima e a sua comparação com o meio de cultura são apresentados na tabela 4. Para determinação do rendimento e cálculo da atividade específica é necessário que sejam realizadas três cromatografias em CMC-52.

Tabela 4. Recuperação proteica e atividade enzimática da rTshyal-1 obtida no processo de purificação em CMC-52 a partir do meio de cultura BMM, pH 7,0.

Passo cromatográfico	Proteína		Atividade Enzimática			
	Massa (mg)	Recuperação (%)	Total (UTR)	Recuperação (%)	Específica (UTR/mg)*	Fator de purificação
Meio de cultura	4,00 (15mL)	100,00	3.353,2	100	838,3	1
C2 CMC-52	0,102 (1mL)	2,55	111,9	3,33	1.097,4	1,3

*Uma unidade de redução turbidimétrica (UTR) é a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 50% (10 µg) de hialuronan após 15 minutos de incubação a 37 °C.

A purificação da rTsHyal-1 apresentou baixo rendimento, provavelmente devido à baixa expressão da hialuronidase no meio de cultura. O protocolo utilizando uma troca catiônica fraca e nas condições do tampão descritas foi o que apresentou melhores resultados quanto a purificação, uma vez que é possível observar que a rTsHyal-1 interagiu com a resina e eluiu com aproximadamente 250 mM de acetato de sódio. Além disso, não foi detectada atividade hialuronidásica no void da coluna, o que indica que toda a rTsHyal-1 presente no meio de expressão foi capaz de interagir com a resina. Adicionalmente, o ensaio de atividade da hialuronidase foi realizado em concentrações similares de acetato de sódio, o que justifica a escolha desse tampão para a purificação.

Os trabalhos que realizaram a expressão da hialuronidase em *P. pastoris* reportam rendimentos variados da proteína recombinante. A Hya de abelha atingiu um rendimento de 0,195 mg/mL (REITINGER et al., 2008), enquanto a H6LHyal de sanguessuga foi expressa na proporção de 0,42 mg/mL (JIN et al., 2014).

Diversos trabalhos demonstraram dificuldades na purificação da hialuronidase recombinante, dentre as quais destaca-se a perda da atividade da enzima quando há necessidade de renaturar as proteínas expressas em *E. coli* (JUSTO JACOMINI et al., 2014; HOFINGER et al., 2007; LU et al., 1995), a proteólise (BERRY et al., 1994; SOLDATOVA et al., 1998) e a ligação irreversível à resina cromatográfica (SOLDATOVA et al., 1998).

A adição da cauda de histidina em uma das extremidades da proteína recombinante poderia auxiliar na sua purificação mediante à utilização de resinas cromatográficas contendo níquel com gradiente de tampão imidazol. Porém, a adição de seis histidinas na proteína pode alterar o seu enovelamento e parâmetros físico-

químicos, interferindo assim, na sua atividade enzimática. Embora muitos trabalhos tenham utilizado essa abordagem para purificação da hialuronidase recombinante (JUSTO JACOMINI et al., 2014; JIN et al., 2014; FERRER et al., 2013), Soldatova et al. (1998) demonstraram que a enzima recombinante de abelha contendo a cauda de histidina na sua região N-terminal apresentou apenas 20% da atividade quando comparada com a sua forma nativa, enquanto a cauda de histidina na região C-terminal resultou em apenas 30% da atividade.

Assim, os trabalhos que optaram pela não adição da cauda nas regiões N- ou C-terminais da hialuronidase para sua expressão heteróloga tiveram que padronizar etapas de purificação específicas, assim como no presente trabalho (CLEMENT et al., 2012; SKOV et al., 2006; REITINGER et al., 2008; HOFINGER et al., 2007; BERRY et al., 1994). A purificação em coluna de troca iônica como primeira etapa cromatográfica empregada nesse trabalho é similar aos métodos utilizados em outros estudos (SKOV et al., 2006; REITINGER et al., 2008; HOFINGER et al., 2007; BERRY et al., 1994). Esse tipo de purificação não é tão agressivo quanto a purificação por fase reversa, o que permite preservar a atividade enzimática da hialuronidase. Clement et al. (2012) e Lu et al. (1995) utilizaram a purificação por fase reversa e não obtiveram a enzima recombinante ativa. Isso se deve provavelmente ao uso da acetonitrila, que atua como agente desnaturante, e à presença de ácido trifluoroacético que confere ao sistema um pH entre 2-3, o que pode levar à perda de atividade da hialuronidase (KOVIRIGIN; POTEKHIN, 2000; GEKKO et al., 1998; PESSINI et al., 2001).

Na tentativa de purificação da rTsHyal-1 foram testadas diversas abordagens cromatográficas como primeira etapa de purificação, dentre elas a troca aniônica, afinidade e gel filtração. Também foram testados o tratamento com agentes desnaturantes, porém não foi possível desfazer o agregado proteico e o todo material era eluído no void ou ocorria perda da atividade da enzima. Como já foi descrito, o melhor resultado foi obtido após a padronização da purificação em coluna CMC-52 como primeira etapa, uma vez que houve interação da proteína recombinante no gradiente de eluição do tampão B e a atividade da hialuronidase não foi detectada no void. Assim, para obtenção do rTsHyal-1 com alto grau de pureza, a fração C2 foi repassada em diversos tipos de colunas cromatográficas, porém os resultados não foram satisfatórios devido ao baixo rendimento da purificação e/ou perda da atividade enzimática.

Com o objetivo de aumentar os níveis de expressão e aprimorar a recuperação da atividade das hialuronidases recombinantes, diversos trabalhos utilizaram a estratégia de

expressão da proteína de interesse com moléculas que auxiliam no enovelamento proteico e na sua solubilidade. Um exemplo é a coexpressão da hialuronidase recombinante com albumina sérica humana, como reportado por Reitinger et al. (2008), o que pode aumentar a estabilidade da proteína recombinante. Além disso, a suplementação do meio de expressão com inibidores de protease pode inibir a proteólise da proteína de interesse (BERRY et al., 1994).

Quando é realizada a expressão de proteínas heterólogas, alguns códons podem não fornecer elevados níveis de expressão da proteína no organismo escolhido. Determinados códons podem ser raros em *P. pastoris* e a sua expressão se torna limitada. Já foi relatado que o aumento das proporções das bases GC na sequência de DNA codificadora podem aumentar os níveis de expressão da proteína (DAILY et al., 2005). Reitinger et al. (2008) observaram que o cDNA da hialuronidase de abelha apresentava diversos códons que raramente são usados em *Pichia* e assim a sequência original pode ser um modelo para uma baixa expressão. Assim, os autores realizaram a otimização dos códons, adequando-os para a sequência que era melhor reconhecida pela *Pichia*. Porém, não observaram alteração significativa nos níveis de expressão proteica, embora a enzima tenha apresentado um aumento na sua atividade. Por outro lado, outras proteínas recombinantes apresentaram aumento do rendimento da expressão após a otimização de códons, como foi observada para o peptídeo recombinantes BmK AngM1 e BmK1 do escorpião *Buthus martensii* Karsch (YANG et al., 2012; WANG et al., 2013).

P. pastoris representa o sistema eucarioto mais utilizado atualmente para a produção de uma diversidade de proteínas heterólogas na forma solúvel, as quais são facilmente secretadas para o meio de cultura. Além disso, esse sistema tem a capacidade de promover o correto processamento e o enovelamento da molécula e a realização de modificações pós-traducionais observadas em eucariotos superiores (LOOSER et al., 2015). Esse fato permite a expressão de proteínas na forma biologicamente ativa, sem a necessidade de etapas adicionais de reenovelamento da molécula, como observado para a expressão em *E. coli*.

Ainda que existam uma diversidade de promotores, sinais de secreção e linhagens disponíveis para expressão em *P. pastoris*, bem como diversas abordagens para aprimorar os níveis de expressão, se faz necessária a caracterização do clone escolhido para expressar a proteína de interesse. Muitas vezes, o clone escolhido como um “produtor superior” em uma triagem em pequena escala pode falhar quando

escalonado para maiores volumes de expressão, uma vez que a alta expressão de uma proteína heteróloga é geralmente prejudicial para o metabolismo e sobrevivência da célula (LOOSER et al., 2015; HOLMES et al., 2009; JAFARI et al., 2011). Portanto é importante que seja realizada a caracterização fisiológica do sistema de expressão, bem como da proteína a ser produzida, através da realização de processos de otimização do método de produção de forma a atingir um maior rendimento da proteína heteróloga.

Embora o presente trabalho tenha obtido um baixo rendimento da rTsHyal-1 com a sua purificação parcial, esse material permitiu a sua análise quanto a estrutura e estabilização da atividade da enzima, sendo um trabalho pioneiro na produção da primeira hialuronidase recombinante de escorpião em sistema de *P. pastoris*.

O número de publicações que utilizam o sistema de *P. pastoris* com a finalidade de produção de moléculas para pesquisa tem aumentado progressivamente durante os últimos anos. Entretanto, poucas hialuronidases foram expressas nesse sistema e os trabalhos comprovam que o uso deste sistema para a produção industrial de proteínas constitui uma alternativa para métodos tradicionalmente empregados, como *E. coli*. Dentro deste contexto, a padronização de um método eficaz de produção heteróloga para hialuronidases em *P. pastoris* permitirá determinar as suas características bioquímicas e estruturais, bem como gerar perspectivas de ampliação do potencial de aplicação terapêutico e biotecnológico dessas enzimas.

4.2.7. Espectrometria de massas

4.2.7.1. Peptide mass fingerprinting (PMF)

A fração C2 extraída do SDS-PAGE, foi submetida à digestão com tripsina e o PMF foi obtido pelo MALDI-TOF/TOF operado no modo linear positivo, utilizando DHB como matriz. A análise do PMF em conjunto com os programas *Sequence Editor* e *BioTools* mostram que os digestos trípticos identificados apresentaram 26,5% de cobertura da sequência da TsHyal-1 (Fig. 30).

Figura 30. PMF da rTsHyal-1 após a digestão com tripsina. O PMF foi obtido por MALDI-TOF/TOF e analisado pelos programas *Sequence Editor* e *BioTools*. O sequenciamento apresentou 26,5% de cobertura da sequência da TsHyal-1 (fragmentos em cinza). Os sítios de glicosilação estão destacados em amarelo.

A análise de glicoproteínas de alta massa molecular por espectrometria de massas é considerada um desafio devido à presença e heterogeneidade das glicosilações (ZAIA et al., 2010). As análises foram realizadas com espectrômetro do tipo Ultraflex II MALDI TOF (*Bruker Daltonics*, Alemanha), que apresenta um processo de ionização branda. A combinação desse sistema com câmera de colisão do tipo CID (*collision-induced dissociation*) pode permitir a obtenção de informações adicionais da amostra analisada devido a fragmentação dos íons. Entretanto, esse sistema pode ser ineficaz quanto a ionização de alguns componentes, dentre eles, as glicoproteínas (GIES et al., 2007). Com a utilização desse tipo de espectrômetro de massas não foi possível elucidar a sequência completa da proteína recombinante.

A rTsHyal-1 apresenta 5 possíveis sítios de N-glicosilação e durante o processo do CID, os glicopeptídeos podem ser fragmentados preferencialmente, suprimindo a ionização a estrutura peptídica não glicosilada e, portanto, levando a uma baixa detecção dos digestos trípticos (MECHREF, 2012). Já foi relatado que os açúcares tendem a suprimir a ionização dos peptídeos (ROTH et al., 2012). Além disso, a

detecção dos peptídeos trípticos contendo glicosilação depende do tipo de açúcar existente. Em particular, oligomanose, principal N-glicosilação realizada pela *P. pastoris*, não sofre clivagem tão facilmente comparado aos outros N-glicanos (ZAIA et al., 2010). Skov et al. (2006) realizou análise semelhante e obteve apenas 64% de cobertura com o PMF da digestão da hialuronidase recombinante de vespa *Vespula vulgaris*. Portanto, esses fatores poderiam explicar o motivo pelo qual não foi possível obter uma maior cobertura do sequenciamento da proteína estudada e nem a massa molecular da proteína intacta.

Na tentativa de obter uma cobertura maior do sequenciamento da rTsHyal-1, foi empregado o nanoACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap. Nessa análise obteve-se 28,6% de cobertura da sequência da hialuronidase (Fig. 31). Os íons detectados foram fragmentados e submetidos à análise no programa *Pmi-Byonic*. Esse programa é capaz de analisar todos os dados de íons obtidos da fragmentação e compará-los com o banco de dados selecionado. Nesse caso, a análise foi realizada contra a sequência da TsHyal-1 (depósito sp|P85841) no formato “*fasta*”. Nessa análise, 47 espectros forneceram 14 peptídeos diferentes referentes à sequência da rTsHyal-1. Dentre eles, apenas dois peptídeos (143–158 e 339–354) foram iguais aos obtidos no ensaio anterior, correspondentes a 8,3% da sequência da enzima. Ou seja, considerando os peptídeos obtidos nos dois ensaios a cobertura da sequência da rTsHyal-1 foi de 46,8%.

Esse espectrômetro de massas apresenta uma célula de colisão do tipo HCD (*Higher energy collisional dissociation*). Esse tipo de fragmentação apresenta maior precisão e reprodutibilidade quando comparado à fragmentação do tipo CID presente no MALDI (PEJCHINOVSKI et al., 2015). Entretanto, essa abordagem não foi capaz de obter uma cobertura muito maior da sequência em relação ao MALDI-TOF, provavelmente devido às glicosilações presentes na proteína recombinante, como já discutido acima.

Figura 31. Peptídeos obtidos pelo aparelho Q-Exactive e analisado pelo programa PMi-Byonic. Foi obtida uma cobertura de 28,6% da sequência da rTsHyal-1.

Adicionalmente, visando ampliar a caracterização estrutural da enzima, foi realizada sua modelagem molecular utilizando como base a sequência da TsHyal-1 e os depósitos de estruturas em bancos de dados. Essa análise foi realizada objetivando também identificar a localização dos fragmentos sequenciados na estrutura da enzima (Fig. 32). Os fragmentos obtidos no Q-Exactive estão destacados no modelo predito pelo programa *Phyre*, no qual 99% dos resíduos modelados apresentaram mais de 90% de confiança. Pode-se observar que os oito fragmentos principais sequenciados por espectrometria de massas encontravam-se na parte externa da molécula, o que pode ter facilitado o acesso da tripsina durante a digestão desses fragmentos. Além disso, nenhum dos fragmentos sequenciados apresentava o sítio de glicosilação, reforçando a hipótese a respeito da glicosilação relatada acima.

Figura 32. Modelagem da TsHyal-1 com os fragmentos sequenciados pelo Q-Exactive. Os fragmentos estão destacados com diversas cores. O modelo foi realizado pelo programa *Phyre* e editado pelo *Discovery Studio 4.1 Visualizer*.

4.2.7.2. Identificação de glicosilações

Diante desse resultado, a rTsHyal-1 obtida do gel foi deglicosilada com a enzima PNGase F. Essa enzima é capaz de clivar entre a ligação da N-acetilglicosamina e resíduo de asparagina das N-glicosilações. A PNGase F cliva praticamente todos os tipos de N-glicosilações, exceto aqueles ligados com fucose (MORELLE; MICHALSKI, 2007).

A massa experimental da rTsHyal-1 estimada por eletroforese é de aproximadamente 49,563 kDa, enquanto, de acordo com a predição do programa *Sequence Editor*, a TsHyal-1 oxidada apresenta massa teórica de 44,605 kDa. A diferença entre a massa estimada por eletroforese e a massa teórica da proteína pode indicar a variação da predição por esse método ou uma possível glicosilação de 4.958 Da. Esse fato corrobora a análise da proteína deglicosilada no MALDI-TOF, no qual foi

observado um íon de 4.515,8 Da após o tratamento com a PNGase F (Fig. 33). Além disso, como já foi relatado acima, a rTsHyal-1 apresenta 5 possíveis sítios de N-glicosilação e a presença do açúcar foi confirmado com a eletroforese corado com reagente de Schiff para detecção de glicoproteínas.

Figura 33. Análise da glicosilação da rTsHyal-1. (A) A massa molecular da proteína recombinante foi estimada por eletroforese em 49,563 kDa. (B) Espectro de massas da rTsHyal-1 deglicosilada com PNGase F obtido por MALDI-TOF MS em matriz DHB operado no modo linear positivo.

Como já foi descrito, o sistema de expressão em *P. pastoris* é capaz de promover modificações pós-traducionais realizadas por seres eucariotos superiores (CEREGRINO e CREGG, 2000). A adição de açúcares na proteína recombinante de peçonhas animais foi relatado para a serinoprotease da serpente *Trimeresurus albolabris*, no qual foram adicionados 2,2 kDa de glicosilação (MUANPASITPORN; ROJNUCKARIN, 2007). Quanto às hialuronidases expressas nesse sistema, nenhum trabalho avaliou a presença da glicosilação com uma modificação pós-traducional nessas proteínas recombinantes. Portanto, essa é a primeira análise quanto à presença de N-glicosilações de hialuronidase recombinante produzida por *P. pastoris*.

Hialuronidases expressas em outros sistemas capazes de realizar esse tipo de modificação pós-traducional, como baculovírus/célula de inseto, apresentam a adição de glicosilações em suas estruturas. Soldatova et al. (1998) relatou a adição de glicosilação de 2 kDa na Hya de abelha. A SFHYA1 recombinante do peixe *Synanceja hórrida*

apresentou um aumento de 4,5 kDa em sua massa molecular, sendo esse aumento foi atribuído à uma possível glicosilação (NG et al., 2005). A Hyal-1 recombinante humana tratada com PNGase F apresentou uma diferença de aproximadamente 4 kDa atribuídos à N-glicosilação. Além disso, a enzima perdeu 40% da sua atividade, o que pode indicar que essa glicosilação possui um papel importante na sua atividade enzimática (HOFINGER et al., 2007). Como já foi descrito acima, a rTsHyal-1 glicosilada e a sua isoforma hiperglicosilada apresentaram atividade hialuronidásica preservada observada na zimografia.

4.2.7.3. Secretoma da *P. pastoris* durante a expressão da rTsHyal-1

O secretômica consiste no estudo geral de proteínas que são secretadas por uma célula, tecido ou organismo em um determinado tempo e em determinadas condições (secretoma) (HATHOUT et al., 2007). As proteínas identificadas no secretoma da *P. pastoris* são responsáveis pelo controle e regulação de diversos processos fisiológicos relevantes para a expressão da proteína recombinante.

O meio de cultura, ao final da expressão, foi submetido à redução, alquilação e digestão e analisado pelo nanoACQUITY UPLC acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Orbitrap. Foram obtidos 783 espectros de massas e os íons obtidos foram analisados pelo programa *PMi-Byonic*. Foi possível identificar 181 peptídeos diferentes referentes à 103 proteínas secretadas pela *P. pastoris* (lista em apêndice).

As proteínas identificadas foram classificadas quanto ao “Gene Ontology” e a classificação das proteínas secretadas de acordo com as suas funções revelaram que a algumas das proteínas apresentavam funções desconhecidas. Entretanto, pode-se observar que a maioria dos compostos identificados estavam relacionados com ligação do ATP, metabolismo de carboidrato e resposta ao estresse oxidativo (Fig. 34).

Recentemente a espécie *P. pastoris* foi reclassificada em um novo gênero, denominado *Komagataella* e subdivida em três espécies: *K. pastoris*, *K. phaffii* e *K. pseudopastoris* (YAMADA et al., 1995; MATTANOVICH et al., 2009). As linhagens utilizadas para aplicação biotecnológica pertencem às espécies *K. pastoris* e *K. phaffii*. As linhagens GS115 e X-33 são *K. phaffii* enquanto as proteases deficientes são classificadas em *K. pastoris* (MATTANOVICH et al., 2009). Embora não se empregue

usualmente essa nomenclatura para a *P. pastoris*, os depósitos em bancos de dados utilizam essa denominação.

Figura 34. Análise dos componentes do secretoma da *P. pastoris* durante a expressão da rTsHyal-1 quanto ao GO. As classes que apareceram apenas uma vez foram agrupadas em “outros processos” e alguns componentes não apresentaram classificação, sendo denominados de “não determinado”. O gráfico mostra os valores em porcentagem.

A compreensão do secretoma do sistema de expressão utilizado poderia auxiliar na obtenção da proteína recombinante de interesse, uma vez que a identificação do perfil das proteínas nativas secretadas fornecem informações que podem aprimorar a expressão da proteína recombinante. Alguns trabalhos variam alguns parâmetros importantes durante a expressão e em conjunto com o secretoma podem avaliar as melhores condições para expressão da proteína recombinante, minimizando também a produção de proteínas nativas (KURTZMAN et al., 2005). Um exemplo é a redução da temperatura, demonstrado por Dragosits et al. (2009), a qual permite que a expressão da proteína recombinante seja mais eficiente, provavelmente pela redução da secreção de proteases nativas.

Entretanto, o impacto desses fatores na expressão heteróloga de proteínas, especialmente para *P. pastoris*, ainda é pouco caracterizado. Embora já tenha sido estudado o secretoma das linhagens GS115 (RENUSE et al., 2014) e X-33 (HUANG et

al., 2011), até o presente momento esse foi o primeiro secretoma realizado para a linhagem de KM71H da *P. pastoris*. O ideal seria realizar um estudo secretômico comparativo utilizando parâmetros diferentes, como suplementação do meio de cultura ou temperatura, para obter resultados mais conclusivos quanto às melhores condições de expressão para rTsHyal-1.

4.2.8. Atividade da hialuronidase

Com o objetivo de caracterizar a atividade enzimática da rTsHyal-1 foram realizados ensaios quanto a sua especificidade sobre substratos e as melhores condições para a reação de hidrólise do hialuronan.

4.2.8.1. Especificidade sobre diferentes substratos

Para avaliar a especificidade da rTsHyal-1, foi realizado o teste de turbidimetria com sulfato de condroitina A, B e C, além do hialuronan, como descrito no item 3.2.9.2.

A rTsHyal-1 apresentou maior atividade sobre o substrato hialuronan, seguido pelos sulfatos de condroitina C, A e B nas condições do ensaio realizado (Fig. 35). Embora essa hialuronidase recombinante tenha degradado parcialmente os sulfatos de condroitina C, A e B, observa-se sua elevada especificidade para hialuronan.

As hialuronidases presentes na peçonha de escorpião são classificadas como EC 3.2.1.35. Essa subclasse é encontrada em espermatozoides de mamíferos, lisossomas, venenos de himenópteros e em peçonhas de serpentes e compreende endo- β -N-acetil-D-hexosaminidases capazes de hidrolisar o hialuronan na posição (β 1 $\rightarrow$ 4) entre os resíduos N-acetil- β -D-glicosamina e D-glucoranato. Essas enzimas são hialuronoglicosaminidases e possuem atividades hidrolítica e de transglicosidase, podendo degradar hialuronan, sulfato de condroitina (principalmente sulfato de condroitina A e sulfato de condroitina C) e, em menor extensão, o sulfato de dermatana (sulfato de condroitina B ou beta-heparina) (STERN; CSÓKA, 2000). Portanto, como já esperado, a rTsHyal-1 de *T. serrulatus* exibiu o perfil de hidrólise sobre diferentes substratos determinado para a sua classe EC 3.2.1.35. Essa é a primeira vez que é avaliada a especificidade sobre substratos para a hialuronidase de *T. serrulatus*.

Figura 35. Atividade da rTsHyal-1 sobre diferentes substratos avaliados através da medida da diminuição de turbidez. A hialuronidase recombinante (aproximadamente 3 μ g) foi incubada por 30 minutos, a 37°C, com 20 μ L de substrato (hialuronan ou sulfatos de condroitina A, B ou C) 0,5 mg/mL em tampão acetato de sódio 200mM em pH 6,0 contendo NaCl 150 mM. Os valores correspondem à média $\pm$ EPM (erro padrão médio, n = 3).

4.2.8.2. Influência da temperatura

Afim de verificar a temperatura ótima de atividade da rTsHyal-1, a reação de hidrólise do hialuronan foi incubada em diferentes temperaturas (Fig. 36).

A rTsHyal-1 apresentou temperatura ótima para atividade por volta de 40°C. Pessini et al. (2001) avaliou esse parâmetro para a hialuronidase nativa isolada da peçonha de *T. serrulatus* e a enzima apresentou valores similares, com a temperatura ótima na faixa de 40°C, mas também altamente ativa entre 30 a 50°C. Algumas enzimas de outros escorpiões apresentaram valores similares, a BmHYA1 do escorpião *Buthus martensi* apresenta a temperatura ótima em 50°C, enquanto que a hialuronidase do escorpião *Heterometrus fulvipes* perde a atividade nessa temperatura (FENG et al., 2008; RAMANAIAH et al., 1990).

Figura 36. Determinação da atividade da rTsHyal-1 em diferentes temperaturas através da medida da diminuição de turbidez. A hialuronidase recombinante (aproximadamente 3 µg) foi incubada por 30 minutos, nas temperaturas avaliadas, com 20 µL de substrato hialuronan (0,5 mg/mL) em tampão acetato de sódio 200 mM em pH 6,0 contendo NaCl 150 mM. Os valores correspondem à média ± EPM (erro padrão médio, n = 3).

Dentre as hialuronidases recombinantes, a Hya de abelha apresentou atividade em uma faixa ampla de temperatura, de 4°C a 90°C, com 34% e 19% de hidrólise do substrato, respectivamente, sendo a temperatura ótima em 62°C (REITINGER et al., 2008). Já a H6LHyal da sanguessuga apresentou maior capacidade de hidrólise do substrato em 45°C e perdeu 100% de atividade quando foi incubada por 30 min a 60°C (JIN et al., 2014). Ambas as hialuronidases foram expressas em *P. pastoris*, portanto, pode-se observar que essa característica é inerente à proteína recombinante e não depende do sistema de expressão utilizado para a sua produção.

4.2.8.3. Influência do pH

A influência do pH na atividade da rTsHyal-1 também foi avaliada durante a reação de hidrólise do hialuronan, com objetivo de avaliar o pH ótimo da enzima. O tampão acetato de sódio 200 mM contendo NaCl 150 mM foi preparado em diferentes pHs (3,0 a 9,0) (Fig. 37).

Figura 37. Determinação da atividade da rTsHyal-1 em diferentes pHs através da medida da diminuição de turbidez. A atividade turbidimétrica foi realizada em tampão acetato de sódio 200 mM contendo NaCl 150 mM em diferentes pH. A hialuronidase recombinante (aproximadamente 0,6 μ g) foi incubada por 30 minutos, a 37°C, com 20 μ L de substrato hialuronan (0,5 mg/mL). Os valores correspondem à média $\pm$ EPM (erro padrão médio, n = 3).

A rTsHyal-1 apresentou pH ótimo para atividade enzimática em 6,0. A hialuronidase nativa de *T. serrulatus* é ativa em uma faixa de pH de 4,0 a 8,5, enquanto a rTsHyal-1 apresentou alta atividade hialuronidase (>60%) entre os pH 6,0 a 9,0. Dentre as formas nativas da hialuronidase de escorpião, geralmente o pH ótimo para atividade varia entre 4,0 e 6,0. As hialuronidasas dos escorpiões *Buthus martensi* e *Palamneus gravimanus* apresentam atividade ótima em pH 4,5 (FENG et al., 2008; MOREY et al., 2006). Enquanto a enzima de *Heterometrus fulvipes* apresenta atividade máxima em pH 4,0 (RAMANAIAH et al., 1990).

As hialuronidasas produzidas em *P. pastoris* apresentam variação quanto ao pH ótimo para a sua atividade. Embora as duas hialuronidasas expressas nesse sistema apresentem uma faixa ampla de atividade que varia entre os pH 3,0 a 8,0, a Hya de abelha apresenta atividade máxima em pH 3,8 (REITINGER et al., 2008), enquanto a H6LHyal da sanguessuga possui pH ótimo em 6,5 (JIN et al., 2014).

Frost et al. (1996) classificam as hialuronidases quanto a seu pH ótimo para atividade: enzima ácido-ativa (ativa entre pH 3,0 e 4,0) ou neutro-ativa (ativa entre pH 5,0 e 6,0). Tanto a hialuronidase nativa quanto a TsHyal-1 recombinante de *T. serrulatus* apresentaram atividade ótima em pH 6,0, portanto as hialuronidases desse escorpião pertencem à classe neutro-ativa.

Em acidentes causados por escorpião, a picada atinge a epiderme na qual o pH pode variar entre 5,0 a 7,4 em um tecido saudável (ÖHMAN; VAHLQUIST, 1998; LAMBERS et al., 2006). Nessa faixa de pH, a hialuronidase de *T. serrulatus* apresenta alta atividade, o que pode auxiliar na difusão dos componentes da peçonha no tecido da vítima, atuando como fator de espalhamento (BORDON et al., 2012).

4.2.9. Avaliação da citotoxicidade da rTsHyal-1

A rTsHyal-1 foi avaliada quanto à citotoxicidade em macrófagos pelo ensaio do MTT. A proteína recombinante não foi tóxica nas concentrações avaliadas, mantendo as células viáveis (Fig. 38).

A viabilidade das células foi mensurada através do ensaio colorimétrico utilizando o sal de tretazólio (MTT; 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico). Esse ensaio consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. A redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) pelas células vivas leva a formação do formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) é quantificada em 570 nm. Dessa maneira, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (MONSMANN, 1983).

Figura 38. Ensaio de citotoxicidade da rTsHyal-1 sobre células de macrófagos. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do MTT. Os valores correspondem à média $\pm$ EPM (erro padrão médio, $n = 4$).

Embora os trabalhos tenham demonstrado que a hialuronidase de peçonha de escorpião não é tóxica por si só, essa enzima é altamente ativa e potencializa os efeitos tóxicos da peçonha (GIRISH et al., 2004, BORDON et al., 2012). Pessini et al. (2001) mostrou que a hialuronidase do escorpião *T. serrulatus* não alterou os níveis de creatina quinase, lactato desidrogenase e aspartato transferase em animal. Além disso, os animais que receberam a hialuronidase associada à Ts1, apresentaram o aumento dessas enzimas mais rapidamente comparado aqueles animais que receberam somente a toxina. Esse fato comprova o papel como “fator de espalhamento” da peçonha pela a hialuronidase e que essa enzima não possui efeitos tóxicos intrínsecos.

Os resultados obtidos com o ensaio do MTT nesse estudo também indicam que embora a proteína recombinante tenha sido produzida em sistema heterólogo em levedura, a *P. pastoris* não produziu nenhum componente que possa afetar a viabilidade celular. Assim, esse material pode ser utilizado para possíveis estudos *in vivo* e *in vitro* sem ser citotóxico para a célula, permitindo a aplicação terapêutica da proteína recombinante.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho apresenta os resultados obtido com a construção da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha do escorpião *T. serrulatus* e a caracterização estrutural e funcional da hialuronidase recombinante expressa em *P. pastoris*.

No transcriptoma foram identificadas várias toxinas da peçonha, como neurotoxinas com ação em canais para sódio do tipo Nav (Ts1, Ts2, Ts3, Ts5), e com ação em canais para potássio do tipo Kv (Ts6, Ts7, Ts8, Ts18, Ts15, Ts16 e Ts19), bem como metaloproteinases, hipotensinas e PAMs. Além disso, foram relatadas novas toxinas como o neuropeptídeo e a Ts16.1, que foram descritas pela primeira vez no transcriptoma da espécie *T. serrulatus*.

No presente estudo também foi realizada a clonagem e expressão heteróloga da isoforma da hialuronidase TsHyal-1 de *T. serrulatus* em sistema de *P. pastoris*. A proteína recombinante foi expressa na sua forma solúvel no meio de cultura e ativa (838,3115 UTR/mg). Os estudos em pequena escala indicaram que a enzima recombinante apresentou maior atividade quando expressa em meio não suplementado, em pH 7,0, durante 96 h da indução da expressão. Nessas condições, as células da levedura também secretaram para o meio proteínas nativas associadas à ligação do ATP, metabolismo de carboidrato e resposta ao estresse oxidativo.

A rTsHyal-1 foi parcialmente purificada por uma troca catiônica fraca e apresentou atividade específica de 1.097,45 UTR/mg. O sequenciamento por espectrometria de massas obteve 46,8% de cobertura da sequência da proteína recombinante. Essa enzima é uma glicoproteína com massa molecular de 49,5 kDa, na qual aproximadamente 4,5 kDa foi atribuída à N-glicosilação. A rTsHyal-1 apresenta especificidade pelo substrato hialuronan, seguido da condroitina C, A e B, o que corresponde a um perfil das enzimas da classe EC 3.2.1.35. Além disso, a enzima apresentou atividade ótima em pH 6,0 e a 40°C e não apresentou citotoxicidade *in vitro* pelo ensaio do MTT.

Esse é o primeiro trabalho que produziu uma hialuronidase recombinante de escorpião em sistema heterólogo *P. pastoris*. Portanto, o sucesso da determinação de um método eficaz de produção heteróloga para hialuronidase ativa em *P. pastoris* é extremamente importante não só para elucidar as suas características bioquímicas e estruturais, mas também para permitir futuras manipulações moleculares, o que pode levar à ampliação do potencial de aplicação biotecnológico e terapêutico das hialuronidases.

Referências

6. REFERÊNCIAS

ABBASIAN, S. S. et al. Cloning, expression, purification and antigenic evaluation of hyaluronidase antigenic fragments recombinant protein of streptococcus pyogenes. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 9, p. 2376-2380, 2014.

ABDEL-RAHMAN, M. A.; QUINTERO-HERNANDEZ, V.; POSSANI, L. D. Venom proteomic and venomous glands transcriptomic analysis of the Egyptian scorpion *Scorpio maurus palmatus* (Arachnida: Scorpionidae). **Toxicon**, v. 74, p. 193-207, 2013.

AIZEMBERG, R. et al. Optimal conditions for biomass and recombinant glycerol kinase production using the yeast *Pichia pastoris*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 329, 2011.

ALMEIDA, F.M. et al. Enzymes with gelatinolytic activity can be found in *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venoms. **Toxicon**, v. 40, n. 7, 2002.

ALMEIDA, D.D. et al. Profiling the resting venom gland of the scorpion *Tityus stigmurus* through a transcriptomic survey. **BMC Genomics**, v.1, p.13-362, 2012.

ALVARENGA, E.R. et al. Transcriptome analysis of the *Tityus serrulatus* scorpion venom gland. **Open Journal of Genetics**, v. 2, p. 210-220, 2012.

ALVES, R. S. et al. Isolation, homology modeling and renal effects of a C-type natriuretic peptide from the venom of the Brazilian yellow scorpion (*Tityus serrulatus*). **Toxicon**, v. 74, p. 19-26, 2013.

BAKKE, M.; KAMEI, J.; OBATA, A. Identification, characterization, and molecular cloning of a novel hyaluronidase, a member of glycosyl hydrolase family 16, from *Penicillium* spp. **FEBS letters**, v. 585, n. 1, p. 115-120, 2011.

BATISTA, C. V. et al. Proteomic analysis of *Tityus discrepans* scorpion venom and amino acid sequence of novel toxins. **Proteomics**, v. 6, n. 12, p. 3718-3727, 2006.

BATISTA, C. V. F. et al. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: biochemical and physiological comparison with other *Tityus*

species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1, p. 147-157, 2007.

BATISTA, C. V. F. et al. Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: biochemical and physiological comparison with other *Tityus species*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 146, p.147-57, 2007.

BERRY, A. M. et al. Cloning and nucleotide sequence of the *Streptococcus pneumoniae* hyaluronidase gene and purification of the enzyme from recombinant *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 3, p. 1101-1108, 1994.

BITENCOURT, C. S. et al. Hyaluronidase recruits mesenchymal-like cells to the lung and ameliorates fibrosis. **Fibrogenesis Tissue Repair**, v. 4, n. 1, p. 3, 2011.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Expression of a new serine protease from *Crotalus durissus collilineatus* venom in *Pichia pastoris* and functional comparison with the native enzyme. **Applied microbiology and biotechnology**, p. 1-16, 2015.

BORDON, K.C.F. et al. Isolation, enzymatic characterization and antiedematogenic activity of the first reported rattlesnake hyaluronidase from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2740-2748, 2012.

BORDON, K.C.F.; VARANDA, W.A.; ARANTES E.C. "Isolation and primary structure of a new scorpion toxin from *Tityus serrulatus* venom." Submitted (MAR-2009) to UniProtKB. UniProtKB 86271 (KA20_TITSE).

BORDON, K.C.F.; COLOGNA, C.T.; ARANTES, E.C. Scorpion Venom Research Around the World: *Tityus serrulatus*. In: GOPALAKRISHNAKONE, P.; SCHWARTZ, E.F.; POSSANI, L.D.; LA VEJA, R.C.R. Scorpion Venoms. 1 ed.: **Springer Netherlands**, v. , p. 1-25, 2014.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

- BRIERLEY, R. A.; DAVIS, R. G.; HOLTZ, C. G. Production of insulin-like growth factor-I in methylotrophic yeast cells. **US 5.324.639**. 19 set. 1994.
- BRIGGS, D. E. G. Scorpions take to the water. **Nature**, v. 326, n. 6114, p. 645-646, 1987.
- BRONDYK, W. H. Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein. **Methods Enzymol**, v.463, p. 131-47, 2010.
- CALVETE, J. J. et al. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v. 583, p. 1736-1743, 2009.
- CARBALLAR-LEJARAZÚ, R. et al. Recombinant scorpine: a multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.65, n. 19, p.3081-3092, 2008.
- CARMO, A.O. et al. Molecular and functional characterization of metalloserrulases, new metalloproteases from the *Tityus serrulatus* venom gland. **Toxicon**, v.90, p. 45-55, 2014.
- CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 24, p. 45-66. 2000.
- CEVALLOS, M. A. et al. Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. **Toxicon**, v. 30, n. 8, p. 925-930, 1992.
- CHIPPAUX, J.P. Epidemiology of envenomations by terrestrial venomous animals in Brazil based on case reporting: from obvious facts to contingencies. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p. 13, 2015.
- CHIPPAUX, JP. Emerging options for the management of scorpion stings. **Drug Design, Development and Therapy**, v.6, p.165–173, 2012.
- CHOI, D. B.; PARK, E.Y. Enhanced production of mouse α -amylase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-batch culture recombinant *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 390-397, 2006.

- CHRISTIE, A. E. In silico characterization of the neuropeptidome of the Western black widow spider *Latrodectus hesperus*. **General and comparative endocrinology**, v. 210, p. 63-80, 2015.
- CHRISTIE, A. E.; CHI, M. Neuropeptide discovery in the Araneae (Arthropoda, Chelicerata, Arachnida): Elucidation of true spider peptidomes using that of the Western black widow as a reference. **General and comparative endocrinology**, v. 213, p. 90-109, 2015.
- CLEMENT, H. et al. Identification, cDNA cloning and heterologous expression of a hyaluronidase from the tarantula *Brachypelma vagans* venom. **Toxicon**, v. 60, n. 7, p. 1223-1227, 2012.
- COLOGNA, C. T. et al. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. **Protein and Peptide Letters**, v. 16, p. 920-932, 2009.
- CORDEIRO, F. A. et al. Arachnids of medical importance in Brazil: main active compounds present in scorpion and spider venoms and tick saliva. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2015.
- CORONA, M. et al. A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. **FEBS Letters**, v. 532, p. 121-126, 2002.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.
- CREGG, J. M. et al. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 3376-3385, 1985.
- CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. **Mol. Biotechnology** v.16, p.23-52, 2000.
- CREGG, J. M.; MADDEN, K. R. Development of yeast transformation systems and construction of methanol-utilization-defective mutants of *Pichia pastoris* by gene disruption. In **Biological Research on Industrial Yeasts** (STEWART, G. G.; RUSSELL, I.; KLEIN, R. D.; HIEBSCH, R. R. Eds.), CRC Press: Boca Raton, pp. 1-18, 1987.

CREGG, J.M. **Methods in Molecular and Cellular Biology: *Pichia* Protocols**, Totowa, NJ: Humana Press, 2007.

CUPO, P. et al. Severe scorpion envenomation in Brazil: clinical, laboratory and anatomopathological aspects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 1, p. 67-76, 1994.

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of molecular recognition**, v. 18, n. 2, p. 119-138, 2005.

DE ALVARENGA, E. R. Transcriptoma da glândula de veneno do escorpião *Tityus serrulatus* no contexto de catálogos de transcritos de quelicerados. 2012, 154 p. Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais.

DE LIMA, M.E. et al.; Animal Toxins: State of the Art. Perspectives in Health and Biotechnology. Ed. UFMG, Belo Horizonte-MG, 2009.

DE OLIVEIRA, U. C. et al. The transcriptome recipe for the venom cocktail of *Tityus bahiensis* scorpion. **Toxicon**, v. 95, p. 52-61, 2015.

DI FERRANTE, N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 220, n. 1, p. 303-306, 1956.

DIEGO-GARCÍA, E. et al. Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of beta-KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 187–200, 2008.

DIEGO-GARCÍA, E. et al. Molecular diversity of the telson and venom components from *Pandinus cavimanus* (Scorpionidae Latreille 1802): transcriptome, venomomics and function. **Proteomics**, v. 12, n. 2, p. 313-328, 2012.

DIEGO-GARCÍA, E. et al. The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function. **Toxicon**, v. 45, n. 3, p. 273-283, 2005.

DIEGO-GARCÍA, E. et al. Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of "orphan" components. **Peptides**, v. 28, p. 31-37, 2007.

DIEGO-GARCÍA, E.; CALISKAN, F.; TYTGAT, J. The Mediterranean scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones, Buthidae): transcriptome analysis and organization of the genome encoding chlorotoxin-like peptides. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 295, 2014.

DOERNER, K. C.; WHITE, B. A. Detection of glycoproteins separated by non-denaturing polyacrylamide-gel electrophoresis using the periodic acid-Schiff stain. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 187, p. 147-150, 1990.

DRAGOSITS, M. et al. The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. **Journal of proteome research**, v. 8, n. 3, p. 1380-1392, 2009.

D'SUZE, G. et al. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of genes from a cDNA library of the scorpion *Tityus discrepans*. **Biochimie**, v. 91, n. 8, p. 1010-1019, 2009.

DURBAN, J. et al. Integrated "omics" profiling indicates that miRNAs are modulators of the ontogenetic venom composition shift in the Central American rattlesnake, *Crotalus simus simus*. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 234, 2013.

ENZYME EXPASY. Disponível em: <http://enzyme.expasy.org/EC/3.2.1.35>. Acesso em: 30 setembro 2015.

ESCOUBAS, P.; KING, G. F. Venomics as a drug discovery platform. **Expert Review of Proteomics**, v. 6, p. 221-224, 2009.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998a.

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998b.

FENG, L.; GAO, R.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion *Buthus martensi*. **Comparative**

Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 148, n. 3, p. 250-257, 2008.

FERREIRA, L.A. et al. Isolation and properties of a new kallikrein inhibitor from *Tityus serrulatus* venom. **Journal of Protein Chemistry**, v. 17, n. 8 p. 799-805, 1998.

FERRER, V. P. et al. A novel hyaluronidase from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom (dietrich's hyaluronidase): From cloning to functional characterization. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n. 5, p. e2206, 2013.

FERRER-MIRALLES, N. et al. General Introduction: Recombinant Protein Production and Purification of Insoluble Proteins. In: **Insoluble Proteins**. Springer New York, p. 1-24, 2015.

FLECTHER, P.L. JR. et al. Vesicle-associated membrane protein (VAMP) cleavage by a new metalloprotease from the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 7405-7416, 2009.

FROST, G. I. et al. Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 236, n. 1, p. 10-15, 1997.

GEKKO, K., et al. Acetonitrile-protein interactions: amino acid solubility and preferential solvation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1387, n. 1-2, p.195-205, 1998.

GENTLEMAN, R.C. et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, v. 5, n. 10, p. R80, 2004.

GIANGIACOMO, K.M.; GARCIA, M.L.; MCMANUS, O.B. Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. **Biochemistry**, v. 31, p. 6719-6727, 1992.

GIES, A. P. et al. MALDI-TOF/TOF CID study of polystyrene fragmentation reactions. **Macromolecules**, v. 40, n. 21, p. 7493-7504, 2007.

GIRISH, K. S. et al. Isolation and characterization of hyaluronidase a “spreading factor” from Indian cobra (*Naja naja*) venom. **Biochimie**, v. 86, n. 3, p. 193-202, 2004.

- GMACHL, M.; KREIL, G. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 8, p. 3569-3573, 1993.
- GOUET, P. et al. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**, v. 15, n. 4, p. 305-308, 1999.
- GUERRERO-VARGAS, J. A. et al. Identification and phylogenetic analysis of *Tityus pachyurus* and *Tityus obscurus* novel putative Na-channel scorpion toxins. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e30478, 2012.
- GUO, X. et al. Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. **Biochimie**, v. 95, p.1784-1794, 2013.
- HARRISON, R.A. et al. Identification of cDNAs encoding viper venom hyaluronidases: cross-generic sequence conservation of full-length and unusually short variant transcripts. **Gene**, v. 392, p. 22-33, 2007.
- HATHOUT, Y. Approaches to the study of the cell secretome. **Expert review of proteomics**, v. 4, n. 2, p. 239-248, 2007.
- HE, Y. et al. Molecular diversity of Chaerilidae venom peptides reveals the dynamic evolution of scorpion venom components from Buthidae to non-Buthidae. **Journal of Proteomics**, v. 89, p. 1–14, 2013.
- HEIMO, H.; PALMU, K.; SUOMINEN, I. Expression in *Pichia pastoris* and Purification of *Aspergillus awamori* Glucoamylase Catalytic Domain. **Protein expression and purification**, v. 10, n. 1, p. 70-79, 1997.
- HIGGINS, D. R.; CREGG, J. M. **Pichia Protocols, Method Molecular Cell Biology**. Totowa-NJ: Humana Press, 1998.
- HMED, B. N.; SERRIA, H. T.; MOUNIR, Z. K. Scorpion peptides: Potential use for new drug development. **Journal of toxicology**, v. 2013, 2013.

- HOFINGER, E. S. A. et al. Recombinant human hyaluronidase Hyal-1: insect cells versus *Escherichia coli* as expression system and identification of low molecular weight inhibitors. **Glycobiology**, v. 17, n. 4, p. 444-453, 2007.
- HOLMES, W. J. et al. Developing a scalable model of recombinant protein yield from *Pichia pastoris*: the influence of culture conditions, biomass and induction regime. **Microbial cell factories**, v. 8, n. 1, p. 35, 2009.
- HORGAN, R. P.; KENNY, L. C. 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. **The Obstetrician & Gynaecologist**, v. 13, n. 3, p. 189-195, 2011.
- HORTA, C. C. R. et al. Molecular, immunological, and biological characterization of *Tityus serrulatus* venom Hyaluronidase: new insights into its role in envenomation. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 2, p. 2693, 2014.
- HUANG, C. Jr. et al. A proteomic analysis of the *Pichia pastoris* secretome in methanol-induced cultures. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 1, p. 235-247, 2011.
- JAFARI, R.; SUNDSTRÖM, B. E.; HOLM, P. Optimization of production of the anti-keratin 8 single-chain Fv TS1-218 in *Pichia pastoris* using design of experiments. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 34-41, 2011.
- JEDRZEJAS, M. J.; STERN, R. Structures of vertebrate hyaluronidases and their unique enzymatic mechanism of hydrolysis. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 61, n. 2, p. 227-238, 2005.
- JIN, P. et al. High-yield novel leech hyaluronidase to expedite the preparation of specific hyaluronan oligomers. **Scientific reports**, v. 4, 2014.
- JOHNSSON, C. et al. Edema treatment during cardiac allograft rejection. **The Journal of heart and lung transplantation**, v. 18, n. 12, p. 1238-1242, 1999.
- JUNG, Y. et al. Production of human hyaluronidase in a plant-derived protein expression system: Plant-based transient production of active human hyaluronidase. **Protein expression and purification**, v. 74, n. 2, p. 181-188, 2010.

JUSTO JACOMINI, D.L. et al. Reactivity of IgE to the allergen hyaluronidase from *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae) venom. **Toxicon**, v. 82, p. 104-111, 2014.

KELLEY, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature protocols**, v. 10, n. 6, p. 845-858, 2015.

KEMPARAJU , K; GIRISH, K. S.; NAGARAJU, S. Hyaluronidases, a neglected class of glycosidases from Snake Venom: Beyond a spreading factor. In: Mackessy SP, editor. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. Boca Raton: CRC Press; pp. 453–473, 2010.

KING, G. Venoms to Drugs: Venom as a Source for the Development of Human Therapeutics. **Royal Society of Chemistry**, 2015.

KING, T.P. et al. Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: Sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 98, n. 3, p. 588-600, 1996.

KOLBE, N.; HAIN, J. Treatment of acute hemorrhoidal crisis using hyaluronidase with local anesthetic prior to surgical excision. **Techniques in coloproctology**, v. 19, n. 8, p. 487-488, 2015.

KOTVISKI, B. M.; BARBOLA, I. F. Aspectos espaciais do escorpionismo em Ponta Grossa, Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 29, n. 9, 2013.

KOVRIGIN, E. L.; POTEKHIN S.A. On the stabilizing action of protein denaturants: acetonitrile effect on stability of lysozyme in aqueous solutions. **Biophys Chem**, v. 83(1), p. 45-59, 2000.

KREIL, G. Hyaluronidases--a group of neglected enzymes. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 4, n. 9, p. 1666, 1995.

KUHN-NENTWIG, L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n.12, p. 2651-2668, 2003.

- KURTZMAN, C. P. Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 55, n. 2, p. 973-976, 2005.
- KUZMENKOV, A. I. et al. Variability of potassium channel blockers in *Mesobuthus eupeus* scorpion venom with focus on kv1.1: an integrated transcriptomic and proteomic study. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 19, p. 12195-12209, 2015.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature** v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAMBERS, H. et al. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. **International journal of cosmetic science**, v. 28, n. 5, p. 359-370, 2006.
- LI, H. et al. Expression of a functional recombinant oleosin-human hyaluronidase hPH-20 fusion in *Arabidopsis thaliana*. **Protein expression and purification**, v. 103, p. 23-27, 2014.
- LIN-CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66. 2000.
- LOKESHWAR, V. B. et al. Hyaluronidase: both a tumor promoter and suppressor. **Seminars in cancer biology. Academic Press**. p. 281-287, 2008.
- LOOSER, V. et al. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1177-1193, 2015.
- LOURENÇO, W. R. Diversity and endemism in tropical versus temperate scorpion communities. **Compte rendu des séances de la société de biogéographie**, v.70, n.3, p. 155-160, 1994.
- LU, G. et al. Sequence identity and antigenic cross-reactivity of white face hornet venom allergen, also a hyaluronidase, with other proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 9, p. 4457-4465, 1995.
- LUNA-RAMÍREZ, K. et al. Characterization of the venom from the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoi*: Molecular mass analysis of components, cDNA sequences and peptides with antimicrobial activity. **Toxicon**, v. 63, p. 44-54, 2013.

LUTZ, A.; MELLO, O. Cinco novos escorpiões brasileiros dos gêneros *Tityus* e *Rhopalurus*. **Folha Médica**, v.3, p.26, 1922.

MA, Y. et al. Transcriptome analysis of the venom gland of the scorpion *Scorpiops jendeki*: implication for the evolution of the scorpion venom arsenal. **BMC Genomics**, v. 1, p. 10:290, 2009.

MA, Y. et al. Molecular diversity of toxic components from the scorpion *Heterometrus petersii* venom revealed by proteomic and transcriptome analysis. **Proteomics**, v. 10, n. 13, p. 2471-2485, 2010.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p. 249-270, 2005.

MARCUSSI, S. et al. Escorpiões: Biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas. In: *Biologia*. **FUNPEC-Editora**, São Paulo, 2011.

MARKOVIĆ-HOUSLEY, Z. et al. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. **Structure**, v. 8, n. 10, p. 1025-1035, 2000.

MARTINDALE: the extra pharmacopoeia. 28th. ed. London: **Pharmaceutical Press**, p. 650, 1982.

MATTANOVICH, D. et al. Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. **Microbial cell factories**, v. 8, n. 1, p. 29, 2009.

MECHREF, Y. Use of CID/ETD mass spectrometry to analyze glycopeptides. **Current protocols in protein science**, p. 12.11. 1-12.11. 11, 2012.

MENZEL, E. J.; FARR, C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. **Cancer Letters**, v. 131, n. 1, p. 3-11, 1998.

MILLE, B. G. et al. Partial transcriptomic profiling of toxins from the venom gland of the scorpion *Parabuthus stridulus*. **Toxicon**, v. 83, p. 75-83, 2014.

- MILLE, B. G. et al. Transcriptomic approach reveals the molecular diversity of *Hottentotta conspersus* (Buthidae) venom. **Toxicon**, v. 99, p. 73-79, 2015.
- Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/animaisp/bases/animaisbrnet.def>. Acesso em: 14 abril 2015.
- MIRJAMALI, N. A. et al. Cloning and expression of the enzymatic region of Streptococcal hyaluronidase. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 17, n. 9, p. 667, 2014.
- MORELLE, W.; MICHALSKI, J. C. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. **Nature protocols**, v. 2, n. 7, p. 1585-1602, 2007.
- MOREY, S. S.; KIRAN, K. M.; GADAG, J. R. Purification and properties of hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. **Toxicon**, v. 47, n. 2, p. 188-195, 2006.
- MORGENSTERN, D. et al. The tale of a resting gland: transcriptome of a replete venom gland from the scorpion *Hottentotta judaicus*. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 695-703, 2011.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.
- MUANPASITPORN, C.; ROJNUCKARIN, P. Expression and characterization of a recombinant fibrinogenolytic serine protease from green pit viper (*Trimeresurus albolabris*) venom. **Toxicon**, v. 49, n. 8, p. 1083-1089, 2007.
- NAIR, R. B.; KURUP, P. A. Investigations on the venom of the South Indian scorpion *Heterometrus scaber*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 381, n. 1, p. 165-174, 1975.
- NASCIMENTO, D. G. et al. Moving pieces in a taxonomic puzzle : Venom 2D-LC / MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). **Toxicon**, v. 47, p. 628–639, 2006.

- NG, H. C. et al. Cloning and molecular characterization of the first aquatic hyaluronidase, SFHYA1, from the venom of stonefish (*Synanceja horrida*). **Gene**, v. 346, p. 71-81, 2005.
- OGATA, H. et al. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p.29-34, 1999.
- ÖHMAN, H.; VAHLQUIST, A. The pH gradient over the stratum corneum differs in X-linked recessive and autosomal dominant ichthyosis: a clue to the molecular origin of the “acid skin mantle”?. **Journal of investigative dermatology**, v. 111, n. 4, p. 674-677, 1998.
- OHYA, T.; KANEKO, Y. Novel hyaluronidase from *Streptomyces*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 198, n. 3, p. 607-609, 1970.
- ORTIZ, E. et al. Antarease-like Zn-metalloproteases are ubiquitous in the venom of different scorpion genera. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, p. 1738-1746, 2013.
- PASCUAL, N. et al. Orcokinin in insects and other invertebrates. **Insect biochemistry and molecular biology**, v.34, n. 11, p. 1141-1146, 2004.
- PEJCHINOVSKI, M. et al. Comparison of higher-energy collisional dissociation and collision-induced dissociation MS/MS sequencing methods for identification of naturally occurring peptides in human urine. **PROTEOMICS-Clinical Applications**, 2015.
- PESSINI A.C.et al. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1495–1504, 2001.
- PETRICEVICH, V. L.; LEBRUN, I. Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions in vitro. **Mediators of Inflammation**, v.1, p. 39-49, 2005.
- PODYMA, K. A. et al. Difference of hyaluronidase produced by human tumor cell lines with hyaluronidase present in human serum as revealed by zymography. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 241, n. 2, p. 446-452, 1997.
- POLIS, G. A. The biology of scorpions. **Stanford University Press**, 1990.

- POSSANI, L. D. et al. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, p. 287-300, 1999.
- POSSANI, L.D. et al. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. **Biochimie**, v. 82, p. 861-868, 2000.
- PRITCHARD, D. G. et al. Characterization of the group B streptococcal hyaluronate lyase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 315, n. 2, p. 431-437, 1994.
- PUCCA, M. B. et al. Influence of post-starvation extraction time and prey-specific diet in *Tityus serrulatus* scorpion venom composition and hyaluronidase activity. **Toxicon**, v. 90, p. 326-336, 2014.
- PUCCA, M. B. et al. Revealing the Function and the Structural Model of Ts4: Insights into the “Non-Toxic” Toxin from *Tityus serrulatus* Venom. **Toxins**, v. 7, n. 7, p. 2534-2550, 2015.
- PUKRITTAYAKAMEE S. et al. The hyaluronidase activities of some southeast Asian snake venoms. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 629–637, 1998.
- PUXBAUM, V.; MATTANOVICH, D.; GASSER, B. Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 7, p. 2925-2938, 2015.
- QUINTERO-HERNÁNDEZ, V. et al. Scorpion venom components that affect ion-channels function. **Toxicon**, v. 76, p. 328-342, 2013.
- QUINTERO-HERNÁNDEZ, V. et al. transcriptome analysis of scorpion species belonging to the *Vaejovis* genus. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0117188, 2015.
- RAMANAIAH, M.; PARTHASARATHY, P. R.; VENKAIAH, B. Isolation and characterization of hyaluronidase from scorpion (*Heterometrus fulvipes*) venom. **Biochemistry international**, v. 20, n. 2, p. 301-310, 1989.
- REITINGER, S. et al. High-yield recombinant expression of the extremophile enzyme, bee hyaluronidase in *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**, v. 57, n. 2, p. 226-233, 2008.

- RENDÓN-ANAYA, M., et al. Global transcriptome analysis of the scorpion *Centruroides noxius*: new toxin families and evolutionary insights from an ancestral scorpion species. **PLoS One**, v.7, n.8, p.43331, 2012.
- RENUSE, S. et al. Proteomic analysis and genome annotation of *Pichia pastoris*, a recombinant protein expression host. **Proteomics**, v. 14, n. 23-24, p. 2769-2779, 2014.
- RICHMAN, P. G.; BAER, H. A convenient plate assay for the quantitation of hyaluronidase in Hymenoptera venoms. **Analytical biochemistry**, v. 109, n. 2, p. 376-381, 1980.
- RODRÍGUEZ-RAVELO, R. et al. The Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* (Scorpiones, Buthidae): component variations in venom samples collected in different geographical areas. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 19, n. 1, p. 13, 2013.
- ROEDING, F. et al. A 454 sequencing approach for large scale phylogenomic analysis of the common emperor scorpion (*Pandinus imperator*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, n. 3, p.826-834, 2009.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in microbial systems. **Frontiers in microbiology**, v. 5, 2014.
- ROSENGREN, S. et al. Clinical Immunogenicity of rHuPH20, a Hyaluronidase Enabling Subcutaneous Drug Administration. **The AAPS journal**, p. 1-13, 2015.
- ROTH, Z; YEHEZKEL, G; KHALAILA, I. Identification and quantification of protein glycosylation. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2012, 2012.
- RUIMING, Z. et al. Comparative venom gland transcriptome analysis of the scorpion *Lychas mucronatus* reveals intraspecific toxic gene diversity and new venomous components. **BMC Genomics**, v.11, p.452, 2010.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

- SANTOS-FILHO, N. A. et al. Heterologous expression and biochemical and functional characterization of a recombinant alpha-type myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* snake. **Biochimie**, v. 105, p. 119-128, 2014.
- SAUCEDO, A. L. et al. New tricks of an old pattern: structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 15, p. 12321-12330, 2012.
- SCHWARTZ, E.F. et al. Transcriptome analysis of the venom gland of the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones). **BMC Genomics**, v. 8, p. 119, 2007.
- SCOPES, R. K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. **Analytical Biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 277-282, 1974.
- SCORPION FILES. Disponível em: <http://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>. Acesso em: 05 fevereiro 2015.
- SHENDURE, J; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature biotechnology**, v.26, p.1135-1145, 2008.
- SHI-KAI, Y. A. N. et al. “Omics” in pharmaceutical research: overview, applications, challenges, and future perspectives. **Chinese journal of natural medicines**, v. 13, n.1, p. 3-21, 2015.
- SILVA, E.C. et al. Cloning and characterization of cDNA sequences encoding for new venom peptides of the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. **Toxicon**, v. 54, n. 3, p. 252-261, 2009.
- SKOV, L. K. et al. Structure of recombinant Ves v 2 at 2.0 Å resolution: structural analysis of an allergenic hyaluronidase from wasp venom. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 62, n. 6, p. 595-604, 2006.
- SMITH, C. R. et al. Draft genome of the red harvester ant *Pogonomyrmex barbatus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 14, p. 5667-5672, 2011.

SOLDATOVA, L. N. et al. Characterization of the N-glycans of recombinant bee venom hyaluronidase (Api m 2) expressed in insect cells. In: **Allergy and asthma proceedings**. OceanSide Publications, Inc, p. 210-215, 2007.

SOLDATOVA, L. N. et al. Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. **Journal of Allergy and Clinical immunology**, v. 101, n. 5, p. 691-698, 1998.

SREEKRISHNA, K. et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 190, p. 55-62, 1997.

STANGIER, J. et al. Orcokinin: a novel myotropic peptide from the nervous system of the crayfish, *Orconectes limosus*. **Peptides**, v. 13, n. 5, p. 859-864, 1992.

STERKEL, M. et al. OKB, a novel family of brain-gut neuropeptides from insects. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 42, n. 7, p. 466-473, 2012.

STERN, R.; CSÓKA, A. B. Mammalian hyaluronidases. 2000. Disponível em: <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hapdf/HA15.pdf>>. Acessado em: 22 março 2015.

STERN, R.; JEDRZEJAS, M. J. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 3, p. 818-839, 2006.

SUCK, R. et al. Purification and immunobiochemical characterization of folding variants of the recombinant major wasp allergen Ves v 5 (antigen 5). **International archives of allergy and immunology**, v. 121, n. 4, p. 284-291, 2000.

TAN, P.T. et al. SCORPION2: a database for structure-function analysis of scorpion toxins. **Toxicon**, v. 47, p. 356-363, 2006.

TERRAZAS, W.D.M.; AIZEMBERG, R.; GATTAS, E. A. L. Using *Pichia pastoris* to produce recombinant glycerol kinase. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 2, p. 279-284, 2014.

THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, v. 25, n. 1, p.25-29, 2000.

THOMAS, P.D.; MI, H.; LEWIS, S. Ontology annotation: mapping genomic regions to biological function. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 1, p. 4-11, 2007.

TYTGAT, J. et al. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, p. 444-447, 1999.

VAN DEN BERG, M. A.; MARUTHACHALAM, K. Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume. Cham: **Springer International Publishing**, 2015.

VENANCIO, E. J. et al. Enzymatic properties of venoms from Brazilian scorpions of *Tityus* genus and the neutralisation potential of therapeutical antivenoms. **Toxicon**, v. 69, p. 180-190, 2013.

VERANO-BRAGA, T. et al. Structure-function studies of *Tityus serrulatus* Hypotensin-I (TsHpt-I): A new agonist of B(2) kinin receptor. **Toxicon**, v. 56, p. 1162-1171, 2010.

WAGSTAFF, S.C.; HARRISON, R. A. Venom gland EST analysis of the saw-scaled viper, *Echis ocellatus*, reveals novel α 9 β 1 integrin-binding motifs in venom metalloproteinases and a new group of putative toxins, renin-like aspartic proteases. **Gene**, v. 377, p. 21-32, 2006.

WALKER, J.M.; RAPLEY, R. Molecular Biology and Biotechnology. 4th Ed. **The Royal Society of Chemistry**, 2002.

WANG, J. et al. Significant expression of a Chinese scorpion peptide, BmK1, in *Escherichia coli* through promoter engineering and gene dosage strategy. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 61, n. 4, p. 466-473, 2014.

WIEZEL, G. A. et al. Identification of hyaluronidase and phospholipase B in *Lachesis muta rhombeata* venom. **Toxicon**, 2015.

WOHLRAB, J. et al. Use of hyaluronidase for pharmacokinetic increase in bioavailability of intracutaneously applied substances. **Skin pharmacology and physiology**, v. 27, n. 5, p. 276-282, 2014.

WULFF, H.; CASTLE, N.A.; PARDO, L.A. Voltage-gated Potassium Channels as Therapeutic Drug Targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 982–1001, 2009.

XIA, X. et al. Cloning and molecular characterization of scorpion *Buthus martensi* venom hyaluronidases: a novel full-length and diversiform noncoding isoforms. **Gene**, v. 547, n. 2, p. 338-345, 2014.

YAMADA, Y. et al. The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Komagataella* gen. nov.(*Saccharomycetaceae*). **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 59, n. 3, p. 439-444, 1995.

YANG, J. L. et al. Codon optimization and eukaryotic expression analysis of the analgesic peptide gene BmK AngM1 from *Buthus martensii* Karsch. **Acta pharmaceutica Sinica**, v. 47, n. 10, p. 1389-1393, 2012.

YANG, S. et al. Enhanced production of recombinant secretory proteins in *Pichia pastoris* by optimizing Kex2 P1' site. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e75347, 2013.

YUAN, C. H. et al. Discovery of a distinct superfamily of Kunitz-type toxin (KTT) from tarantulas. **PLoS One**, v. 3, n. 10, p. e3414, 2008.

ZAIA, J. Mass spectrometry of oligosaccharides. **Mass spectrometry reviews**, v. 23, n. 3, p. 161-227, 2004.

ZHANG, B. et al. Transcriptome analysis of *Deinagkistrodon acutus* venomous gland focusing on cellular structure and functional aspects using expressed sequence tags. **BMC genomics**, v. 7, n. 1, p. 152, 2006.

Apêndice

APÊNDICE

LISTA DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO SECRETOMA DA *P. pastoris* POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Proteínas	Identificação (UNIPROT)	Melhor hit	Número Espectros	Número de peptídeos únicos	Número de MPT	% Cobertura	Número de aminoácidos	Intensidade do íon
1 1	>tr C4R0Q7 C4R0Q7_PICPG Major exo-1,3-beta-glucanase of the cell wall	687.4	37	7	0	21	414	2.94E+07
2 2	>tr F2QNF8 F2QNF8_PICP7 1,3-beta-glucanosyltransferase OS=K. pastoris	722.6	27	5	0	12.5	538	1.30E+07
3 3	>tr F2QPL8 F2QPL8_PICP7 Glucan 1,3-beta-glucosidase OS=K. pastoris	640.2	27	7	0	27.3	311	2.81E+07
4 4	>tr F2QX14 F2QX14_PICP7 Heat shock 70 kDa protein OS=K. pastoris	814.1	19	7	1	12	657	1.11E+07
5 5	>tr F2QRD4 F2QRD4_PICP7 Transmembrane channel-like protein 5 OS=K. pastoris	734.3	51	3	1	2.3	797	3.12E+07
6 6	>sp P02787 TRFE_HUMAN Serotransferrin OS=Homo sapiens	375	21	8	0	13.5	698	5.36E+06
7 7	>tr F2QUR1 F2QUR1_PICP7 Putative secreted protein OS=K. pastoris	474.1	23	3	0	5	686	5.28E+06
8 8	>tr X2GM95 X2GM95_CERNI Serum albumin OS=Cervus nippon	552	28	5	0	9.1	583	1.12E+07
9 9	>tr F2QXH5 F2QXH5_PICP7 PRY1 protein OS=K. pastoris	481.7	20	4	0	13.1	313	1.56E+07
10 10	>tr F2QYV4 F2QYV4_PICP7 Putative secreted protein OS=K. pastoris	449	19	3	0	11.7	469	3.03E+06
11 11	>tr F2QQJ2 F2QQJ2_PICP7 1,3-beta-glucanosyltransferase OS=K. pastoris	510	14	4	0	12.7	490	4.91E+06
12 12	>tr F2QYW1 F2QYW1_PICP7 Heat shock 70kDa protein 1/8 OS=K. pastoris	575.2	11	4	1	7.4	645	5.63E+06
13 13	>tr F2QXM5 F2QXM5_PICP7 Zonadhesin OS=K. pastoris	586.1	18	2	0	5.3	587	1.08E+07
14 14	>tr F2QSQ9 F2QSQ9_PICP7 C-jun-amino-terminal kinase-interacting protein 3 OS=K. pastoris	619	8	2	0	12.4	233	6.76E+06
15 15	>tr C4QW42 C4QW42_PICPG Chitin deacetylase, biosynthesis ascospore wall component OS=K. pastoris	551.5	10	3	1	15.7	305	7.64E+06
16 16	>tr F2QR41 F2QR41_PICP7 ATP synthase subunit beta OS=K. pastoris	481.4	5	3	1	6.6	503	1.92E+06
17 17	>sp Q7ZA46 PGK_PICPA Phosphoglycerate kinase OS=K. pastoris	288.6	5	2	0	9.4	416	6.56E+05
18 18	>tr F2QUI7 F2QUI7_PICP7 Putative secreted protein OS=K. pastoris	786.2	7	1	0	16.4	116	8.30E+06
19 19	>tr F2QME5 F2QME5_PICP7 Endo-1,3-beta-glucanase OS=K. pastoris	389.6	6	2	0	4	1017	1.90E+06
20 20	>tr F2QXG9 F2QXG9_PICP7 Enolase OS=K. pastoris	354.3	12	6	1	20.2	436	1.93E+06
21 21	>tr F2QTW5 F2QTW5_PICP7 glucose-regulated protein OS=K. pastoris	369.6	7	3	0	4.3	678	1.31E+06
22 22	>tr F2QLY4 F2QLY4_PICP7 Aconitate hydratase 1 OS=K. pastoris	409.2	6	2	0	3.2	780	1.10E+06
23 23	>tr F2QP19 F2QP19_PICP7 Putative secreted protein OS=K. pastoris	426.6	4	1	0	5.4	448	7.41E+05
24 24	>tr F2R0H2 F2R0H2_PICP7 Cytochrome c OS=K. pastoris	430	10	3	0	11.8	110	3.95E+06

25	25	>tr F2QY05 F2QY05_PICP7 Protein disulfide-isomerase OS=K. pastoris	357.9	7	3	0	9.3	517	2.20E+06
26	26	>sp Q9P4D1 ACT_PICPG Actin OS=K. pastoris	497.1	14	2	0	6.4	376	4.23E+06
27	27	>tr F2QTT6 F2QTT6_PICP7 C5a peptidase OS=K. pastoris	183.4	5	3	0	2.8	1630	4.39E+05
28	28	>tr F2QQY4 F2QQY4_PICP7 Autophagy-related protein 27 OS=K. pastoris	258.2	3	1	0	7	270	6.78E+05
29	29	>tr F2R0E1 F2R0E1_PICP7 Protein NCA3, mitochondrial OS=K. pastoris	395.5	5	1	0	3.8	346	1.68E+06
30	30	>tr F2QVJ7 F2QVJ7_PICP7 Heat shock 70kDa protein 1/8 OS=K. pastoris	293.4	1	1	0	2.3	613	2.14E+05
31	31	>tr F2QV86 F2QV86_PICP7 Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3 OS=K. pastoris	310.8	2	1	0	2.1	524	6.33E+05
32	32	>tr F2QRM3 F2QRM3_PICP7 Transaldolase OS=K. pastoris	249	3	2	0	9	324	5.87E+05
33	33	>tr V5LTF3 V5LTF3_CERNI Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Cervus nippon	290.3	7	1	0	6.6	151	3.48E+06
34	34	>tr F2QST1 F2QST1_PICP7 Heat shock protein sti1 homolog OS=K. pastoris	321.8	3	1	0	1.7	572	6.79E+05
35	35	>tr C4R5F9 C4R5F9_PICPG Cytochrome c oxidase assembly protein/Cu2+ chaperone OS=K. pastoris	270.8	3	1	0	36.7	60	6.87E+05
36	36	>tr F2QN77 F2QN77_PICP7 Heat shock cognate protein HSP 90-beta OS=K. pastoris	274.5	8	3	1	5.7	706	2.23E+06
37	37	>tr F2QML6 F2QML6_PICP7 Aspartate aminotransferase OS=K. pastoris	277.2	3	2	0	6.6	426	5.23E+05
38	38	>tr F2QNL1 F2QNL1_PICP7 Pichia pastoris CBS 7435 chromosome 1, replicon sequence OS=K. pastoris	377.8	4	1	0	1.1	857	1.76E+06
39	39	>tr F2QNM0 F2QNM0_PICP7 H+-transporting ATPase OS=K. pastoris	257.5	2	1	0	1.3	896	4.79E+05
40	40	>tr F2QWT5 F2QWT5_PICP7 Putative secreted protein OS=K. pastoris	322.3	3	1	0	1.9	473	5.25E+05
41	41	>tr F2R033 F2R033_PICP7 Heat shock protein 60 OS=K. pastoris	357.8	7	1	0	1.3	698	2.26E+06
42	42	>tr F2QP50 F2QP50_PICP7 Laminin subunit beta-1 OS=K. pastoris	339.5	31	1	0	3.8	213	4.19E+07
43	43	>tr F2QZQ3 F2QZQ3_PICP7 Protein STB2 OS=K. pastoris	256.4	23	1	0	1.2	864	1.91E+07
44	44	>tr F2QM85 F2QM85_PICP7 Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate OS=K. pastoris	272.8	1	1	0	1.8	725	2.64E+05
45	45	>tr F2QQG8 F2QQG8_PICP7 Elongation factor 1-alpha OS=K. pastoris	223.4	7	2	0	4.1	459	1.19E+06
46	46	>tr F2QZM5 F2QZM5_PICP7 Uncharacterized WD repeat-containing protein alr3466 OS=K. pastoris	235.2	7	1	0	2.7	490	2.21E+06
47	47	>tr F2QU52 F2QU52_PICP7 Putative secreted protein OS=K. pastoris	150	2	1	0	3.2	464	1.25E+05
48	48	>tr F2QMT7 F2QMT7_PICP7 Ketol-acid reductoisomerase OS=K. pastoris	176.9	2	1	0	3.5	398	2.08E+05
49	49	>tr F2QTH2 F2QTH2_PICP7 THUMP domain-containing protein 1 OS=K. pastoris	172.2	3	1	0	3.7	273	6.38E+05
50	50	>tr F2QN85 F2QN85_PICP7 Uncharacterized protein YMR185W OS=K. pastoris	313.6	6	1	0	0.9	920	2.07E+06

51	51	>tr F2QPF8 F2QPF8_PICP7 Acyl-CoA-binding protein OS=K. pastoris	129.9	2	1	0	20.9	86	3.16E+05
52	52	>tr F2QU02 F2QU02_PICP7 14-3-3 protein homolog OS=K. pastoris	286.6	4	1	0	3.1	257	8.31E+05
53	53	>tr F2QQT0 F2QQT0_PICP7 Nucleoside diphosphate kinase OS=K. pastoris	140.2	1	1	0	11.2	152	1.46E+05
54	54	>tr F2R063 F2R063_PICP7 tri-snRNP-associated protein 1 OS=K. pastoris	175.6	24	1	0	1.8	599	1.14E+07
55	55	>tr F2QLB2 F2QLB2_PICP7 DNA repair protein RAD57 OS=K. pastoris	169.1	3	1	0	1.9	427	8.30E+05
56	56	>tr F2QQH7 F2QQH7_PICP7 Polyadenylation factor subunit 2 OS=K. pastoris	302.9	4	1	0	3	439	5.09E+06
57	57	>tr F2R037 F2R037_PICP7 Lysophospholipase OS=K. pastoris	159.2	2	1	0	2.5	633	2.56E+05
58	58	>tr F2QTE2 F2QTE2_PICP7 Alcohol dehydrogenase OS=K. pastoris	215.9	1	1	0	3.6	360	1.33E+05
59	59	>tr F2QVL1 F2QVL1_PICP7 YALI0D21648p OS=K. pastoris	134.1	1	1	0	3.5	492	3.92E+06
60	60	>tr F2QM14 F2QM14_PICP7 Uncharacterized protein OS=K. pastoris	176.2	7	1	0	5	139	5.56E+06
61	61	>tr F2QR02 F2QR02_PICP7 Cytochrome c peroxidase OS=K. pastoris	89.2	1	1	0	5.3	376	2.76E+05
62	62	>tr F2QV19 F2QV19_PICP7 Uncharacterized protein OS=K. pastoris	222.3	13	1	0	3.1	450	4.69E+06
63	63	>tr F2QSD0 F2QSD0_PICP7 Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase OS=K. pastoris	147.9	6	1	0	2.7	591	2.97E+06
64	64	>tr F2QZC7 F2QZC7_PICP7 Uncharacterized protein OS=K. pastoris	69.2	5	1	0	5	320	9.66E+05
65	65	tr F2QZF6 F2QZF6_PICP7 Sulfite reductase (NADPH) flavoprotein alpha-component OS=K. pastoris	123.2	4	1	0	0.9	1060	7.59E+06
66	66	>tr F2QT56 F2QT56_PICP7 Methionyl-tRNA synthetase OS=K. pastoris	124.6	4	1	0	2.6	547	1.19E+06
67	67	>tr F2QNB5 F2QNB5_PICP7 Ell1-associated factor 1 OS=K. pastoris	130.9	4	1	0	4	375	1.78E+06
68	68	>sp Q92263 G3P_PICPA Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=K. pastoris	136.6	2	1	0	2.7	333	2.08E+05
69	69	>tr F2QWA0 F2QWA0_PICP7 Factor arrest protein 10 OS=K. pastoris	159.9	3	1	0	2	447	5.99E+05
70	70	>tr F2QX17 F2QX17_PICP7 Sphingolipid long chain base-responsive protein PIL1 OS=K. pastoris	236.9	2	1	0	3.3	302	3.76E+05
71	71	>tr F2QR06 F2QR06_PICP7 Catalase OS=K. pastoris	74.2	2	1	0	3.7	510	1.21E+05
72	72	>tr F2QQ27 F2QQ27_PICP7 Flocculation protein FLO9 OS=K. pastoris	120.1	1	1	0	2.5	471	1.28E+05
73	73	>tr F2QLH2 F2QLH2_PICP7 Protein transport protein SEC31 OS=K. pastoris	73.4	1	1	0	4.6	371	9.50E+04
74	74	>tr F2QLJ2 F2QLJ2_PICP7 Uncharacterized protein OS=K. pastoris	205.1	2	2	0	1.9	701	5.72E+05
75	75	>tr T2A536 T2A536_YEASX S-adenosylmethionine synthase OS=Saccharomyces cerevisiae	175.2	1	1	0	3.4	384	1.47E+05
76	76	>tr F2QV27 F2QV27_PICP7 Adenosylhomocysteinase OS=K. pastoris	99.7	1	1	0	2.9	445	8.97E+04
77	77	>tr F2QTS4 F2QTS4_PICP7 Protein dopey OS=K. pastoris	23	1	1	0	1.1	1684	2.78E+05
78	78	>tr C4R2J6 C4R2J6_PICPG Histone H4 OS=K. pastoris	219.8	2	1	0	6.8	103	7.87E+05
79	79	>tr F2QR55 F2QR55_PICP7 Uncharacterized protein OS=K. pastoris	28.6	1	1	1	6	299	4.56E+05

80 80	>sp C4R8E8 PURA_PICPG Adenylosuccinate synthetase OS=K. pastoris	128.8	14	1	0	3	428	1.10E+07
81 81	>tr F2QN45 F2QN45_PICP7 Uncharacterized protein OS=K. pastoris	125.1	4	1	0	6.5	260	1.18E+06
82 82	>tr F2R016 F2R016_PICP7 E3 ubiquitin-protein ligase BRE1 OS=K. pastoris	275	16	1	0	1.8	503	3.15E+07
83 83	>tr F2QS15 F2QS15_PICP7 Acetyl-coenzyme A synthetase OS=K. pastoris	190	30	1	0	1	668	2.42E+07
84 84	>tr F2QZ70 F2QZ70_PICP7 RNA polymerase I-specific transcription initiation factor RRN10 OS=K. pastoris	50.9	2	1	0	7.4	217	3.51E+05
85 85	>tr F2QTD8 F2QTD8_PICP7 Uncharacterized protein OS=K. pastoris	90.8	5	1	0	1.8	836	2.55E+06
86 86	>tr F2R0D3 F2R0D3_PICP7 Protoporphyrinogen oxidase OS=K. pastoris	91.2	20	1	0	2.9	560	4.48E+06
87 87	tr F2QW00 F2QW00_PICP7 Rab proteins geranylgeranyltransferase component A OS=K. pastoris	37.5	2	1	0	3	638	2.29E+05
88 88	>tr F2QLW1 F2QLW1_PICP7 Origin recognition complex sub. 5 OS=K. pastoris	35.4	2	1	0	3	463	9.88E+05
89 89	>tr F2QNK3 F2QNK3_PICP7 Proline dehydrogenase OS=K. pastoris	176.2	1	1	0	2.7	473	1.11E+05
90 90	>tr F2R098 F2R098_PICP7 Kinesin-like protein OS=K. pastoris	133	7	1	1	1.6	678	2.79E+06
91 91	>tr F2QZ14 F2QZ14_PICP7 Protein csh3 OS=K. pastoris	44.9	2	1	0	6.9	262	1.94E+05
92 92	>tr F2QVG8 F2QVG8_PICP7 Putative transcription factor SEF1 OS=K. pastoris	2.1	1	1	0	2.8	844	1.69E+05
93 93	>tr F2QST5 F2QST5_PICP7 Peroxisomal membrane protein PEX29 OS=K. pastoris	17.3	1	1	0	6.6	499	2.47E+05
94 94	>tr F2QMK6 F2QMK6_PICP7 F-type H+-transporting ATPase oligomycin sensitivity protein OS=K. pastoris	131.6	3	1	0	7.3	205	1.29E+06
95 95	>tr F2QPP4 F2QPP4_PICP7 Protein translocase subunit secA OS=K. pastoris	5.2	1	1	0	7.4	258	7.81E+04
96 96	>tr F2QVT9 F2QVT9_PICP7 Splicing factor 3A subunit 3 OS=K. pastoris	69.5	1	1	0	3.7	509	6.23E+04
97 97	>tr C7AGU1 Endocellulase EG12 OS=Thanatephorus cucumeris	105.3	2	1	0	5.4	259	2.44E+06
98 98	>tr F2QWM4 F2QWM4_PICP7 Molecular chaperone DnaK OS=K. pastoris	51	1	1	0	2.8	647	1.43E+05
99 99	>tr F2QVZ9 F2QVZ9_PICP7 40S ribosomal protein S12 OS=K. pastoris	141.4	1	1	0	6.9	144	3.30E+05
100 100	>tr F2QT25 F2QT25_PICP7 Histone H2B OS=K. pastoris	168.4	1	1	0	6.8	132	1.60E+05
101 101	>tr F2QWI5 F2QWI5_PICP7 Acetyl-coenzyme A synthetase OS=K. pastoris	2.6	1	1	0	2.1	672	7.86E+05
102 102	>tr F2QWW3 F2QWW3_PICP7 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating OS=K. pastoris	23.4	2	2	0	5.5	492	2.97E+05
103 103	>sp P46463 PEX1_PICPA Peroxisome biosynthesis protein PAS1 OS=K. pastoris	54.2	1	1	0	1.4	1157	1.19E+05

Anexo

ANEXO

CERTIFICADO DE REGULARIDADE – IBAMA

03/08/2015

IBAMA - Serviços On-Line - Certificado de Regularidade

Ministério do Meio Ambiente Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
CADASTRO TÉCNICO FEDERAL CONSULTA PÚBLICA A CERTIFICADO DE REGULARIDADE - CR					
Registro n.º:	1506748	Data da consulta:	03/08/2015	CR emitido em:	01/06/2015
				CR válido até:	01/09/2015
Dados básicos					
CNPJ:	63.025.530/0026-62				
Razão social:	FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP				
Nome fantasia:	FMRP - CRIADOURO CIENTÍFICO DA USP				
Data de abertura:	21/05/1952				
Endereço					
Logradouro:	AV. BANDEIRANTES 3900		Complemento:	CAMPUS DA USP	
N.º:	3900		Município:	RIBEIRÃO PRETO	
Bairro:	MONTE ALEGRE		UF:	SP	
CEP:	14049-900				
Cadastro Técnico Federal de Atividades Potencialmente Poluidoras e Utilizadoras de Recursos Ambientais – CTF/APP					
Categoria		Detalhe			
20 - Uso de Recursos Naturais		45 - criação científica de fauna silvestre para fins de pesquisa			
20 - Uso de Recursos Naturais		41 - utilização do patrimônio genético natural - coleta de material biológico com finalidade científica ou didática			
<p>Conforme dados disponíveis na presente data, a pessoa jurídica acima possui Certificado de Regularidade em conformidade com as obrigações cadastrais e de prestação de informações ambientais sobre as atividades desenvolvidas sob controle e fiscalização do Ibama, por meio do CTF/APP.</p> <p>O certificado de regularidade emitido pelo CTF/APP não desobriga a pessoa inscrita de obter licenças, autorizações, permissões, concessões, alvarás e demais documentos exigíveis por instituições federais, estaduais, distritais ou municipais para o exercício de suas atividades.</p> <p>O Certificado de Regularidade do CTF/APP não habilita o transporte e produtos e subprodutos florestais e faunísticos.</p>					
Fechar					