UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Expressão heteróloga e caracterização de duas toxinas do
escorpião *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(a): Francielle Almeida Cordeiro

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Eliane Candiani Arantes
Braga

**Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Toxicologia em 02/06/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.**

Ribeirão Preto
2017

RESUMO

CORDEIRO, F. A. **Expressão heteróloga e caracterização de duas toxinas do escorpião *Tityus serrulatus***. 2017. 112f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Os escorpiões estão entre os animais peçonhentos mais antigos da Terra, existindo por mais de 400 milhões de anos. As peçonhas desses animais contêm uma mistura complexa de proteínas e peptídeos capazes de interagir com alta complexidade no organismo de suas vítimas. No Brasil, o principal gênero de escorpião responsável pelos acidentes é o gênero *Tityus*, no qual estão inseridas as espécies *T. serrulatus*, *T. bahiensis*, *T. obscurus* e *T. stigmurus*. A peçonha do *T. serrulatus* é composta em sua maioria de peptídeos com ação em canais para sódio e potássio, mas possuem também enzimas como hialuronidases, proteases e outros compostos como hipotensinas, peptídeos antimicrobianos (PAMs) e peptídeos potenciadores de bradicinina. Muitos dos componentes encontrados nas peçonhas de escorpiões têm sido estudados por possuírem importantes atividades farmacológicas, como propriedades analgésicas, antimicrobianas, antitumorais e anti-inflamatórias. Todavia, sabe-se que há uma grande dificuldade na obtenção dessas substâncias em consequência do baixo rendimento dos componentes isolados a partir da peçonha. Com isso, atualmente, tem sido utilizada a expressão heteróloga de proteínas para viabilizar a obtenção de toxinas em quantidades suficientes para uso biotecnológico. Diante desse panorama, o presente trabalho teve como objetivo a expressão de dois peptídeos presentes na peçonha de *Tityus serrulatus*, bem como sua comparação com os peptídeos nativos com relação à sua estrutura e atividade funcional. As toxinas escolhidas foram a Ts8 e a Ts8-propeptídeo, também chamada de *scorpine-like*, que atuam em canais para potássio (KTxs). As sequências e os cDNAs moldes das toxinas expressas foram obtidos da biblioteca de cDNA da glândula de *Tityus serrulatus* construída em nosso laboratório. Os genes sintéticos contendo as toxinas de interesse foram transformados em células de *Pichia pastoris* da linhagem KM71H. A expressão das Ts8 e Ts8-propeptídeo recombinantes revelou a presença das toxinas, porém as mesmas sofreram degradação proteolítica por enzimas da *P. pastoris*. Dessa forma, foram realizadas as avaliações das expressões na presença de substrato como os casaminoácidos, bem como na diminuição do pH, temperatura e adição de inibidores de protease. Além disso, foi possível obter a rTs8, embora clivada, com atividade sobre canais para potássio. Novas etapas de purificação em colunas de troca iônica e fase reversa foram padronizadas para a obtenção das toxinas nativas a partir da peçonha de *T. serrulatus*. Adicionalmente, foi possível identificar a presença da Ts8 e Ts8-propeptídeo (*scorpine-like*) nativas por espectrometria de massas em uma das frações obtidas da cromatografia da peçonha. A adição de casaminoácidos foi favorável para a expressão das toxinas, porém não foi suficiente para minimizar a degradação proteolítica. Ensaio funcionais com os fragmentos das toxinas recombinantes e com as toxinas nativas demonstraram a liberação de citocinas como TNF- α e IL1- β em algumas das toxinas testadas. Além disso, as toxinas demonstraram inibir o crescimento da *Pichia pastoris* em teste antifúngico e não foram tóxicas para células de macrófagos alveolares nas concentrações testadas. Assim, esse trabalho contribuiu para demonstrar a atividade de enzimas proteolíticas na expressão em *P. pastoris*, avaliar as condições em que são liberadas, bem como demonstrar a atividade da rTs8 em ensaio eletrofisiológico e a atividade antifúngica das toxinas recombinantes e nativas.

Palavras chaves: *Pichia pastoris*, *Tityus serrulatus*, Ts8, *scorpine-like*.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os escorpiões são artrópodes que têm sobrevivido por mais de 400 milhões de anos. Eles estão entre os animais mais antigos da Terra, e fazem parte do Filo Artropoda, Classe Arachnida e ordem Scorpiones. Na ordem Scorpiones existem cerca de 18 famílias, dentre elas a Buthidae com 90 gêneros e 1105 espécies. Os gêneros de maior relevância médica, por causarem envenenamentos graves, pertencem à família Buthidae, dentre eles o *Tityus*, *Centruroides*, *Mesobuthus*, *Hemiscorpius*, *Parabuthus*, *Leiurus*, *Buthus*, *Androctonus Hottentotta* e *Androctonus* (MARCUSI; ARANTES; SOARES, 2011; SCORPION FILES, 2017).

De acordo com Chippaux et al. (2012), a estimativa de acidentes por escorpiões no mundo é de 1,5 milhões de casos com 2600 óbitos por ano. Desses óbitos, a maioria são crianças, que são mais sensíveis aos efeitos do envenenamento, podendo ter as funções cardiovascular, respiratória e neuromuscular comprometidas.

Os acidentes com animais peçonhentos, nos quais se enquadram as serpentes, escorpiões, entre outros, são considerados uma condição negligenciada pela WHO, *World Health Organization* (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs373/en/>). Apesar disso, o envenenamento por esses animais não tem recebido a devida atenção dos órgãos responsáveis e continua fazendo vítimas fatais. De acordo com dados do Sinan, o número de acidentes com animais peçonhentos vem crescendo a cada ano (Fig. 1A) (SINAN, 2017).

O escorpionismo é o tipo de acidente com animal peçonhento que mais ocorre no Brasil, chegando a 47% do total. No ano de 2015, o número registrado até Outubro foi de 49.762 casos, com 77 óbitos. Em 2014, o número de acidentes com escorpiões ultrapassou o número recorde de 88 mil casos (SINAN, 2017). Além disso, de acordo com o SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), a região Nordeste foi a região com maior incidência de acidentes em 2015, seguidas da região Sudeste, Norte, Centro-Oeste e Sul do país (Fig. 1B) (SINAN, 2017).

A

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
■ Escorpiões	37368	40283	50239	51754	59164	65128	79716	88277	49762
■ Serpentes	26.573	27685	29638	29663	30092	29306	28394	27170	18565
■ Aranhas	22772	21559	24459	24719	26187	25585	29958	27085	19276
■ Abelha	5370	5884	7122	7372	9581	10307	10854	14205	8815
■ Lagartas	3290	4081	4240	3414	3815	3898	3750	3530	2536

*Dados coletados até Outubro de 2015 e sujeitos à revisão

B

Figura 1. Epidemiologia dos acidentes. (A) Acidentes por animais peçonhentos nos anos de 2007 a 2015. Os acidentes por escorpiões são os que mais ocorrem no Brasil. Dados do SINAN atualizados até Outubro de 2015. **(B) Porcentagem de acidentes por escorpiões de acordo com a região do Brasil.** A região Nordeste possui a maior porcentagem de casos, seguidas da região Sudeste, Norte, Centro-Oeste e Sul. Dados obtidos do SINAN relativos ao ano de 2015.

O aumento do número de casos de escorpionismo se deve a vários fatores, principalmente à crescente ocupação dos espaços antes inabitados. Com a urbanização cresce o número de lixo, esgotos, cemitérios, que são os habitats preferidos das baratas, principal alimento dos escorpiões. Estas condições propiciam o aumento do número de animais e do contato entre o humanos e escorpiões, contribuindo para o aumento dos acidentes. Adicionalmente, o número de envenenamentos notificados aumentou significativamente quando estes acidentes passaram a ser de notificação obrigatória pelo SINAN, o que permitiu uma melhor avaliação deste problema. Mesmo assim, muitas vezes na zona rural ou áreas afastadas esses casos não são notificados (CORDEIRO et al., 2015).

Outro fator que contribui para o elevado número de acidentes é que o *T. serrulatus* se reproduz por partenogênese, ou seja, não existe a diferenciação entre machos e fêmeas e não há fecundação. Nesse caso, cada animal é capaz de gerar seus filhotes sozinho e o número é de aproximadamente 20 filhotes por ninhada. (MARCUSSEI; ARANTES; SOARES, 2011).

O gênero *Tityus* é o maior responsável pelos acidentes com escorpiões no Brasil. As espécies *Tityus bahiensis*, *Tityus obscurus*, *Tityus stigmurus* e *Tityus serrulatus* (Ts) são as principais causadoras de envenenamentos, sendo *T. serrulatus* a espécie mais perigosa e responsável pelo maior número de acidentes (PETRICEVICH e LEBRUN, 2005).

O *T. serrulatus* é assim denominado pois possui uma serrilha no segmento dorsal. Ele é também conhecido como escorpião amarelo pois seus pedipalpos e a falsa cauda são amarelados (Fig. 2) (CORDEIRO et al., 2015).

O espécime adulto apresenta cerca de 7 cm e é encontrado principalmente nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo. Sendo o estado de Minas Gerais o que possui o maior número de casos registrados. No entanto, os escorpiões dessa espécie têm se disseminado para outros estados do país onde antes não eram encontrados, principalmente por se esconderem em cargas que são transportadas por trens ou caminhões (MARCUSSEI; ARANTES; SOARES, 2011).

Figura 2. *Tityus serrulatus* ou escorpião amarelo. Fonte: Laboratório de Toxinas Animais.

O envenenamento causado pelo *T. serrulatus* pode ocasionar manifestações locais e/ou sistêmicas, dependendo da gravidade do acidente (CUPO, 2003). Dentre as manifestações locais podemos destacar a dor intensa no local e irradiada pelo membro atingido, eritema e edema. O tratamento nesses casos é apenas sintomático com bloqueio anestésico em alguns casos (CUPO, 2015).

Quando o paciente apresenta manifestações sistêmicas, o envenenamento é denominado moderado ou grave. Nesses casos podem ser observadas alterações na pressão arterial, com hiper ou hipotensão, agitação, vômitos, diarreia, arritmias e em casos mais graves edema agudo de pulmão e falência cardiorespiratória, podendo levar à morte. O tratamento é o suporte das condições vitais e aplicação da soroterapia com o soro antiescorpiônico (SAE) ou com o soro antiaracnídico (SAAr) (MARCUSSE; ARANTES; SOARES, 2011).

Os casos de envenenamentos severos afetam vários sistemas do organismo da vítima, como o sistema nervoso, muscular, cardiovascular, respiratório, endócrino, e até o sistema digestivo. Todos esses sistemas são afetados devido à admirável quantidade de diferentes substâncias encontradas na peçonha de *T. serrulatus*. A ação destes componentes, principalmente em canais para sódio e canais para potássio, leva a uma grande liberação de mediadores pelas terminações nervosas, que são responsáveis pela maioria dos sinais e sintomas observados no envenenamento (CORDEIRO et al., 2015; PUCCA et al., 2015).

A peçonha do *T. serrulatus* é constituída por uma mistura complexa de centenas de componentes de origem apócrina, produzida por glândulas exócrinas localizadas no último segmento pós-abdominal, chamado télson (MARCUSSE; ARANTES; SOARES, 2011).

Diferentemente da peçonha de serpentes, que são compostas em sua grande maioria de enzimas, a peçonha escorpiônica consiste, principalmente, de pequenas proteínas e peptídeos sem atividade enzimática, porém, com potente ação farmacológica em canais iônicos (CHIPPAUX et al., 2012).

Estudos anteriores revelaram que a peçonha de *T. serrulatus* é cerca de duas a três vezes mais tóxica do que a peçonha do *T. bahiensis* e que o componente majoritário, a neurotoxina Ts1 é uma das responsáveis por essa toxicidade. Além disso, sabe-se que a dieta desses animais e o habitat podem influenciar a composição de suas peçonhas (PUCCA et al., 2014; CORDEIRO et al., 2015).

Apesar de grande parte da peçonha de *T. serrulatus* ser composta de neurotoxinas, ela possui outras proteínas e peptídeos com diversas ações. Um exemplo é a enzima hialuronidase, que catalisa a quebra do substrato hialuronan, encontrado na matriz extracelular de tecidos conjuntivos moles. A hialuronidase é conhecida como “fator de espalhamento” pois contribui para a difusão das toxinas da peçonha no envenenamento (PUKRITTAYAKAMEE et al., 1988; PESSINI et al., 2001).

Além disso, já foram identificadas proteases na peçonha de *T. serrulatus*. De acordo com Bertazzi (2005), essas proteases foram capazes de ativar o sistema complemento, podendo participar do processo inflamatório decorrente do envenenamento.

Venancio et al. (2013) testaram a peçonha de escorpião do gênero *Tityus* com relação à sua atividade proteolítica e encontraram atividade sobre o substrato Abz-FLRRV-EDDnp, atividade que foi inibida por 1,10-fenantrolina, indicando a presença de metaloproteases nas peçonhas de *T. bahiensis*, *T. serrulatus* e *T. stigmurus*.

Carmo et al. (2014) encontraram no cDNA da glândula do *T. serrulatus* 10 diferentes sequências que correspondem à metaloproteases, que foram denominadas metalloserrulases. Essas enzimas podem estar relacionadas a processos pós-traducionais da peçonha através da remoção de peptídeos sinais e propeptídeos. Além disso, observou-se que a clivagem de peptídeos pelas metalloserrulases ocorreu perto de resíduos básicos, indicando que essas proteases preferem resíduos básicos como sítio de clivagem.

Cerni et al. (2016) citam como exemplo da clivagem pós-traducional a que ocorre com a neurotoxina Ts19. A Ts19 é encontrada no transcriptoma do *T. serrulatus*, porém na peçonha foram encontradas até o momento apenas peptídeos produtos de clivagem dessa toxina, descritos como Ts19 Frag-I e Ts19 Frag-II (LIMA et al., 2015).

Já as toxinas que atuam em canais iônicos têm sido estudadas visando, muitas vezes,

seu uso como ferramentas no estudo destes canais, para elucidação de suas estruturas, funcionamento, mecanismo de ação e papel fisiológico (COLOGNA et al., 2009).

As neurotoxinas de escorpiões são divididas em 4 grupos: 1) peptídeos com atividade moduladora de canais para Na^+ ; 2) peptídeos com atividade bloqueadora de canais para K^+ ; 3) peptídeos que inibem canais para Cl^- e 4) peptídeos que modulam a atividade de canais para Ca^{2+} (SILVA et al., 2009). Sendo que as toxinas que atuam em canais para Na^+ e para K^+ são as mais descritas e estudadas.

Todas essas toxinas para canais iônicos atuam em sinergismo, ocasionando a liberação de diferentes neurotransmissores na fenda sináptica, que por sua vez, irão resultar em efeitos paradoxais e complicações graves nas vítimas (PUCCA et al., 2015).

1.1. Toxinas de escorpião e canais para sódio

Os canais para sódio dependentes de voltagem (Nav) são compostos por uma subunidade α de aproximadamente 260 kDa com quatro domínios (DI-DIV), onde cada domínio possui 6 segmentos de α -hélice (S1-S6) e uma alça entre os segmentos S5-S6 que forma o filtro de seletividade para o sódio. O segmento S4 (sensor de voltagem) é o mais conservado e apresenta sequências repetitivas contendo um resíduo de aminoácido básico (arginina ou lisina) seguido por dois resíduos hidrofóbicos. Acredita-se que os segmentos S4 movem-se para fora sob a influência do campo elétrico da membrana, para iniciar uma mudança conformacional que abre os poros, levando à ativação do canal (YU e CATTERALL, 2003; PEIGNEUR et al., 2015).

A alça intracelular que liga os domínios III e IV também contém uma sequência altamente conservada de três aminoácidos hidrofóbicos (isoleucina, felinalanina e metionina) por isso denominado sítio IFM. Esses aminoácidos são responsáveis pela inativação do canal (Fig. 3) (PEIGNEUR et al., 2015).

Figura 3. Representação do canal para sódio dependente de voltagem. Os domínios homólogos são numerados de I-IV e as α -hélices vão dos segmentos 1 ao 6. Os sensores de voltagem são os segmentos S4 e o portão de inativação (IFM) é a alça entre os domínios III e IV. A alça em verde é o sítio de interação das toxinas do tipo α (sítio 3) e as alças em rosa são os sítios de interação das toxinas do tipo β (sítio 4). Fonte: MARCUSSI; ARANTES; SOARES, 2011.

Durante os últimos anos, as toxinas com atividade em canais para Na^+ têm sido extensivamente analisadas. Primeiro, por estarem presentes em grandes proporções na peçonha e, conseqüentemente, serem alvo de estudos pioneiros sobre toxinas escorpiônicas, e segundo, porque essa classe é a principal responsável pelos efeitos mais lesivos nos envenenamentos (QUINTERO-HERNANDEZ et al., 2013).

As toxinas que atuam em canais para sódio podem se ligar em diferentes sítios do canal, distintos não só pelo local em que a toxina atua mas também pelo resultado de suas ações (PEIGNEUR et al., 2015). O sítio 1 está localizado na alça do poro entre os segmentos S5 e S6 de cada domínio. Um exemplo de toxina que atua nesse local é a tetrodotoxina (TTX), isolada do peixe baiacu. Na figura 3 podemos notar os diferentes sítios e os exemplos de toxinas que atuam em cada um (MARCUSSE; ARANTES; SOARES, 2011).

O sítio 3 é localizado na alça extracelular que conecta os segmentos S3 e S4 do domínio IV. Acredita-se que outras partes do canal, como as alças extracelulares dos segmentos S4 e S5 dos domínios I e IV também contribuam na interação e ligação das toxinas com o sítio 3 (BOSMANS e TYTGAT, 2007).

As toxinas da peçonha de escorpiões que atuam nesses canais interagem com os

sítios 3 e 4 e são classificadas em α - e β -toxinas, respectivamente (Fig. 3). As α -toxinas (α -NaScTx) alteram a inativação dos canais para Na^+ , tornando-a lenta e geralmente incompleta, retardando, assim, a repolarização da membrana, o que resulta no prolongamento do potencial de ação (MARCUSSE; ARANTES; SOARES, 2011).

Elas podem ser classificadas em: α -toxinas clássicas, que atuam em canais para Na^+ preferencialmente de mamíferos e não atuam em canais de insetos; as α -NaScTx anti-insetos, que atuam preferencialmente em canais para Na^+ desses animais e as α -like NaScTx, que atuam tanto em canais para Na^+ de mamíferos quanto de insetos (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013).

As toxinas do tipo β (β -NaScTx) ligam-se ao sítio receptor 4 dos canais para Na^+ e induzem alteração da dependência de voltagem da ativação na direção hiperpolarizante. Essa alteração leva a um aumento da tendência da membrana em deflagrar potenciais espontâneos e repetitivos. Correntes de Na^+ para o interior das células são observadas em potenciais de membrana mais negativos do que aqueles em que elas ocorrem normalmente. Além da alteração da ativação do canal, estas toxinas causam significativa redução na magnitude do pico da corrente de Na^+ durante o pulso despolarizante (GRANIER, et al., 2009; COLOGNA et al. 2009).

As β -NaScTx são classificadas em: β_m , que atuam em canais para Na^+ de mamíferos; β_i que atuam preferencialmente em canais para Na^+ de insetos; as β -like que atuam tanto em canais para mamíferos quanto para insetos e as $\beta\alpha$ que tem uma estrutura primária de β -toxinas mas atividade funcional de α -toxinas (BOSMANS e TYTGAT, 2007).

Embora cada toxina aparentemente atue em um sítio específico nos canais para sódio, Peigneur et al. (2015) propuseram que a nomenclatura deve ser revista, já que a Ts1, toxina majoritária da peçonha de *T. serrulatus*, que é classificada como uma β -NaScTx, se liga também em outros sítios do canal.

Até o momento foram isoladas e caracterizadas do escorpião *T. serrulatus* 5 α -neurotoxinas que são a Ts2, Ts3, Ts5, Ts 17 e a Ts18 e a β -neurotoxina Ts1. (BORDON; COLOGNA; ARANTES, 2015).

1.2. Toxinas de escorpião e canais para potássio

Os canais para potássio possuem a maior e a mais diversificada família de canais iônicos. Entre as famílias podemos citar a 2TM-Kir, a 4TM, os canais para potássio

dependentes de voltagem (K_V), os Sk e Slo (Fig. 4) (GONZÁLEZ et al., 2012).

Entre os tipos conhecidos de canais para K^+ , o maior grupo são os canais para potássio dependentes de voltagem (K_V), que nos humanos estão agrupados em 12 subfamílias, K_{V1} – K_{V12} , que se diferenciam pelas estruturas (números de segmentos transmembrana) e funções (SWARTZ, 2004; GRIZEL et al., 2014).

Os canais para potássio do tipo *Shaker*, por exemplo, estão associados à subfamília K_{V1} ($K_{V1.1}$ - $K_{V1.8}$) e são bem estudados, sendo grande parte dos bloqueadores desses canais provenientes de peçonhas animais (MOUHAT et al., 2008). Eles constituem o maior alvo para toxinas de escorpiões e possuem um papel importante na liberação do Ca^{2+} , na secreção proliferação e migração celular (MARTIN-EAUCCLAIRE et al., 2016).

Já as isoformas $K_{V2.1}$ e $K_{V2.2}$ pertencem à subfamília *Shab*, também conhecida como K_{V2} . Elas são encontradas em células de órgãos como cérebro, coração, rim, pulmão, retina e pâncreas. Apresentam ligantes específicos para toxinas de alguns aracnídeos, como aranhas, e com a toxina Ts15, isolada do *T. serrulatus* (MOUHAT et al., 2008; PUCCA, BERTOLINI, et al., 2016).

Outras subfamílias de canais para potássio são a *Shaw* (K_{V3}), encontrada no cérebro, e a *Shal* (K_{V4}) com 3 isoformas, presentes no cérebro, musculatura lisa e coração, as quais são bloqueadas por toxinas de escorpiões e aranhas. Já as subfamílias K_{V5} , K_{V6} , K_{V8} e K_{V9} podem desenvolver canais heteromultiméricos com subunidades α da subfamília K_{V2} . Porém, quando sozinhas, não são capazes de compor canais funcionais para potássio (MOUHAT et al., 2008).

A subfamília *Eag* (K_{V10} , K_{V11} e K_{V12}) foi a última a ser descrita, e suas isoformas foram encontradas no sistema nervoso central. Sabe-se pouco sobre essas isoformas, porém a $K_{V10.1}$ ou EAG, tem sido estudada e relacionada com transformações oncogênicas (MOUHAT et al., 2008).

Fonte: González et al. 2012 modificada.

Figura 4. Canais para potássio e suas famílias. Fonte: GONZÁLEZ et al. 2012 modificada.

Os canais para potássio dependentes de voltagem (K_V) são constituídos por associação de 4 subunidades α formada por seis segmentos transmembrana (Fig. 5) e quatro subunidades β menores. Cada subunidade possui duas hélices transmembrana internas e um *loop* externo formando o poro da membrana (MARTIN-EAUCLAIRE et al., 2016).

Figura 5. Representação da subunidade α do canal para potássio. Na figura estão representados os 6 segmentos transmembrana, que constituem a subunidade α do canal. Fonte: GRIZEL, GLUKHOV, SOKOLOVA, 2014. Modificada.

A região S4 é a região sensível à voltagem. Ela possui vários resíduos de aminoácidos carregados positivamente (Fig. 5). Os segmentos S5 e S6 juntamente com o loop originam a região formadora do poro, já os segmentos S3 e S4 constituem uma estrutura que se assemelha a um remo, cuja função é a abertura e fechamento do canal (DOYLE et al., 1998; CATTERALL et al., 2007).

As toxinas que atuam em canais para K^+ (KTxs) são classificadas até o momento em α , β , γ , κ , δ , ε e λ , atuam através do bloqueio físico ou modulação do canal, impedindo o fluxo de íons K^+ (CREMONEZ et al., 2016).

As α -KTxs são pequenos peptídeos (23-43 resíduos de aminoácidos) ligadas por 3 ou 4 pontes dissulfeto, sendo que duas pontes são altamente conservadas e possuem um enovelamento chamado de *CS α / β scaffold*. São a subfamília mais comum desse grupo (MOUHAT et al., 2008).

As β -KTxs são caracterizadas por peptídeos longos (cerca de 60 aminoácidos) e 3 pontes dissulfeto e também possuem a estrutura *CS α / β scaffold*. As β -KTxs são subdivididas em três grupos: (1) Peptídeos semelhantes à TsTx-K β (também conhecida como Ts8) do escorpião *T. serrulatus*; (2) Peptídeos semelhantes à BmTxK β do escorpião chinês *Buthus martensii* Karsch e (3) Peptídeos *scorpine-like*, que possuem atividade citolítica e antimicrobiana do tipo defensina e sequência similar à classe 1 (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013).

As γ -KTxs são peptídeos de 36-47 aminoácidos, 3 pontes dissulfeto e que bloqueiam canais para potássio do tipo *Herg* (ether-à-go-go), tanto de humanos quanto de ratos (QUINTERO-HERNÁNDEZ et al., 2013).

As κ -KTxs são bloqueadores fracos de canais para potássio e com estrutura terciária diferente dos grupos anteriores, sendo do tipo *CS $\alpha\alpha$* , onde as duas hélices são ligadas por uma alça (RODRIGUEZ DE LA VEGA e POSSANI, 2004). As δ -KTxs são toxinas *Kunitz-type*, que além de bloquear canais para potássio também possuem atividade inibidora de serinoproteases (YUAN et al., 2008).

Já as ε -KTxs foram classificadas recentemente através de um estudo de Cremonez et al (2016), que identificaram uma toxina denominada Ts11 que tem estrutura de um Inibidor do tipo *Cystine Knot* (ICK), porém sem a estrutura secundária clássica de α -hélice ou folha β .

O estudo a partir dessas toxinas permitiu a identificação, localização e classificação de novos subtipos de canais para potássio, bem como a determinação da estrutura e atividade farmacológica desses canais (BERGERON; BINGHAM, 2012).

Foi proposto que as toxinas apresentam um par (díade) de aminoácidos-chave na sua estrutura, também chamado de díade funcional, que desempenha um papel fundamental para a interação das toxinas com canais para potássio descritos na família *Shaker*. Essa díade funcional é formada por uma lisina (Lys) e um resíduo de aminoácido com características hidrofóbicas, como leucina (Leu), tirosina (Tyr) ou fenilalanina (Phe), separadas por uma distância de aproximadamente 7 Å (DAUPLAIS et al., 1997).

Além da díade funcional, foram propostos outros mecanismos de ação para a interação das toxinas com os canais K_v. (1) O anel básico ou *basic ring*, formado por quatro ou cinco resíduos básicos ao redor da díade funcional, estabilizam a interação com o canal. (2) O modelo “*Apamin-like*” propõe que os resíduos básicos da α -hélice são os responsáveis pela interação com canais para potássio ativados por cálcio (RODRÍGUEZ DE LA VEGA e POSSANI, 2004). (3) O modelo “Two-heads”, proposto para γ -KTxs, que se ligam em canais do tipo ERG. Estes canais possuem uma α -hélice extra na sua porção interna, permitindo que essas toxinas interajam tanto com essa hélice quanto com o vestíbulo do canal, formando o modelo de duas cabeças. (4) O modelo *hERG Hot-Spot*, proposto para as α -KTxs, que interagem tanto com canais *hERG* quanto com K_v. Acredita-se que os aminoácidos básicos nas posições 19 e 20 são os responsáveis por essa interação (RODRÍGUEZ DE LA VEGA e POSSANI, 2004).

Até o momento, na peçonha de *T. serrulatus* já foram descritas diversas toxinas que atuam em canais para potássio. As α -KTxs Ts6, Ts7, Ts9, Ts15 e Ts16 e as β -KTxs Ts8, Ts8-propeptídeo (também chamada de *scorpine-like*), Ts19, Ts19 Frag-I e Ts19 Frag-II (BORDON; COLOGNA; ARANTES, 2015).

Os K_vs estão relacionados a inúmeros processos fisiológicos no organismo e desempenham um papel fundamental no entendimento dos mecanismos de excitabilidade das células. Esses canais são responsáveis pela repolarização do potencial de ação, bem como da contração muscular, entre outros (ISLAS, 2016).

Várias toxinas animais específicas para canais do tipo K_v já foram descritas e avaliadas como potenciais drogas de uso terapêutico (LEWIS e GARCIA, 2003; WANKE e RESTANO-CASSULINI, 2007; LEWIS, 2009; CHEN et al., 2012; DAVE e LAHIRY, 2012; XIE et al., 2012). As KTxs têm sido consideradas promissoras, como por exemplo, no tratamento de doenças autoimunes e do câncer, onde há uma superexpressão dos canais para potássio (WULFF et al., 2009).

No caso das toxinas que se ligam em canais para potássio, a maioria tem alta

afinidade pelos canais do tipo Kv1., principalmente os canais do tipo Kv 1.2 e Kv 1.3 (MARTIN-EAUCCLAIRE et al., 2016).

As toxinas que se ligam especificamente em canais para potássio do tipo Kv 1.3, por exemplo, são importantes alvos terapêuticos como imunossupressores, já que esse canal é expresso em linfócitos T e desempenha um papel importante na ativação dessas células (SPENCER et al., 1993). Além disso, tem sido demonstrado em diversos estudos que esse canal é expresso em membranas de células T e por isso, tem sido considerado um alvo para supressão dessas células (PUCCA et al., 2015).

Pucca et al. (2016a) confirmaram que a Ts6 e a Ts15 foram capazes de bloquear com alta eficiência o Kv 1.3 e realizaram testes com a toxina e células CD4⁺ do tipo *naive*, células efetoras, células de memória central e de memória efetora. A Ts6 inibiu significativamente a proliferação de células CD4⁺ de memória efetora e a produção de interferon- γ . Além disso, os autores demonstraram por estudos *in vivo* que as toxinas tiveram um efeito protetor sobre a hipersensibilidade do tipo tardia, o que torna essa toxina um alvo terapêutico sobre doenças autoimunes. A Ts15 bloqueou o canal Kv2.1 e os autores confirmaram a expressão desse canal em células CD4⁺ e CD8⁺.

As células T são classificadas em células T efetoras, células T de memória central, células T de memória efetora e células T *naive*. As células T de memória efetoras têm sido associadas a diferentes doenças autoimunes e o canal Kv 1.3 é altamente expresso nessas doenças, como esclerose múltipla, artrite reumatoide, entre outras (LEWIS, GARCIA, 2003).

O bloqueio desse canal está relacionado à diminuição do influxo de Ca²⁺, tornando a ativação e proliferação de células T prejudicadas. Dessa forma, toxinas que bloqueiam esses canais podem ser alvos terapêuticos para o tratamento de doenças autoimunes (ZHAO et al., 2015).

1.3. Toxinas de escorpião com atividade antimicrobiana

As toxinas de escorpião, embora tenham em grande parte ação em canais iônicos, também possuem atividades diversas, entre elas a antimicrobiana. Os PAMs (peptídeos antimicrobianos) são encontrados em várias espécies e possuem função de proteção da glândula contra ação de microrganismos bem como de facilitar a ação de neurotoxinas (HARRISON et al., 2014).

PAMs de escorpiões são peptídeos anfipáticos carregados positivamente e divididos em 3 categorias: peptídeos que contêm cisteínas e pontes dissulfeto; peptídeos com α -hélice anfipática, porém sem resíduos de cisteína e peptídeos ricos em prolina e glicina (HARRISON et al., 2014).

Exemplos de toxinas de escorpião que contêm cisteínas são as *scorpine*-likes. A *scorpine* é um peptídeo antimicrobiano catiônico que foi descoberto na peçonha do escorpião *Pandinus imperator*. Ela possui 75 aminoácidos e sua sequência amino-terminal é semelhante à das cecropinas (primeiros peptídeos catiônicos completamente caracterizados de insetos) e das defensinas. Por esse motivo, as *scorpines* foram consideradas um híbrido entre cecropinas e defensinas. A *scorpine* também demonstrou ter uma alta atividade antimalárica (CONDE et al., 2000).

Além disso, a *scorpine* demonstrou um potente efeito inibitório em dois estágios de desenvolvimento do *Plasmodium berghei*. Essa toxina tem sido considerada um peptídeo promissor nos estudos recentes de drogas antimaláricas. O desenvolvimento de um fungo transgênico que expressa *scorpine* demonstrou bloquear a transmissão do *Plasmodium* por mosquitos infectados (FANG et al., 2011).

Além da atividade antiparasitária, as *scorpines* e toxinas *scorpine-like* têm demonstrado possuir atividade inibitória em K_{VS} (embora a maioria se ligue a esses canais com baixa afinidade), atividades citolíticas e antimicrobianas. Recentemente, um estudo realizado por ressonância magnética nuclear e atividades biológicas de duas versões truncadas de um peptídeo *scorpine-like* demonstraram que os dois peptídeos reduziram a viabilidade de cisticercos de *Taenia crassiceps* e induziram apoptose de *Entamoeba histolítica* (FLORES-SOLIS et al., 2016).

Com relação aos PAMs que não possuem cisteínas, esses são divididos em 3 categorias: peptídeos de cadeia longa; peptídeos de cadeia intermediária e peptídeos de cadeia curta. Entre os exemplos desse grupo estão a Hadurin, PAM derivado da peçonha do escorpião mexicano *Hadrurus aztecus* e a opistoporin 1 e 2 derivadas do escorpião sul africano *Opisthophthalmus carinatus*. Dentre o grupo das de cadeia curta se encontram também as TsAP-1 e TsAP-2 do *T. serrulatus*, que possuem apenas 17 resíduos de aminoácidos e demonstraram atividade antimicrobiana e antitumoral (GUO et al., 2013; HARRISON et al., 2014).

Diante da ampla possibilidade de aplicação terapêutica das toxinas escorpiônicas, faz-se necessário o aprofundamento de estudos que as caracterizem estrutural e

funcionalmente com objetivo de auxiliar no esclarecimento do mecanismo de ação da peçonha, além de colaborar para o desenvolvimento de novas terapias para tratar os casos de envenenamento. Adicionalmente, os estudos detalhados dessas toxinas podem revelar novos alvos terapêuticos para as mesmas.

1.4. Ts8 e Ts8-propeptídeo

A Ts8 e Ts8-propeptídeo fazem parte da família das β -KTxs. A Ts8 se encontra na classe 1, em que estão as bloqueadoras de Kvs e a Ts8-propeptídeo está incluída na classe 3, por ser *scorpine-like*, ou seja, tem sequência similar à classe 1, porém também com propriedades de defensinas. Segundo alguns estudos realizados, o efeito bloqueador de potássio dessas toxinas parece residir na sua região C-terminal, enquanto que o efeito antimicrobiano e de defensinas reside na parte N-terminal dos compostos (MARTIN-EAUCCLAIRE et al., 2016).

A Ts8, também chamada de TsTx-K β ou TsK2, possui 60 resíduos de aminoácidos com 3 pontes dissulfeto na sua estrutura e uma massa molar de 6716 Da (LEGROS et al., 1998). Essa toxina demonstrou bloquear canais para potássio dependentes de voltagem de sinaptosomas de cérebro de ratos (ROGOWSKI et al., 1994). É considerada uma β -KTx e sua sequência de aminoácidos foi deduzida a partir de um clone da biblioteca de *T. serrulatus* (KALAPOTHAKIS et al., 2001).

Diego-García et al (2008) demonstraram que a Ts β KTx, toxina do escorpião *Tityus stigmurus* semelhante à Ts8 inibiu os Kvs 1.1, 1.2 e 1.3, sendo a IC₅₀ de inibição do Kv 1.1 de 185 nM.

Recentemente, um trabalho do nosso grupo demonstrou que a Ts8 nativa de *T. serrulatus* foi capaz de inibir seletivamente o canal Kv 4.2 com IC₅₀ de 313 $\pm$ 40 nM. O canal Kv 4.2 está relacionado à atividade nociceptiva e sugere-se então que esta toxina pode estar relacionada à dor prolongada e intensa no envenenamento (PUCCA, CERNI, et al., 2016). Essa possível nova função relacionada à Ts8 pode abrir caminhos tanto para o entendimento do envenenamento, quanto para possíveis estudos farmacológicos.

A *scorpine-like* ou Ts8-propeptídeo do escorpião *Tityus serrulatus* possui uma sequência de 68 aminoácidos com 43% de identidade com a *scorpine* do *P. imperator*. Essa toxina é idêntica à Ts8, com exceção dos 8 primeiros aminoácidos, que não são encontrados na Ts8 (LEGROS et al., 1998; ROGOWSKI et al., 1994).

Toxinas semelhantes à *scorpine* (*scorpine-like*) têm demonstrado possuir atividade antimicrobiana e antiparasitária. Dessa maneira, a clonagem e expressão dessas toxinas seriam relevantes tanto para a busca de novos tratamentos antimicrobianos e antiparasitários, quanto para a melhor compreensão de seus mecanismos e importância no envenenamento (ORTIZ et al., 2015).

1.5. Clonagem e expressão de toxinas

Apesar da grande relevância de estudos com toxinas nativas de escorpiões para revelar suas possíveis aplicações biotecnológicas, sabe-se que há uma grande dificuldade no desenvolvimento das pesquisas, em consequência da pequena quantidade disponível de peçonha e do baixo rendimento dos componentes isolados.

Dessa forma, há um aumento no número de estudos que visam à obtenção desses compostos através da expressão heteróloga de proteínas, produzindo toxinas em quantidades suficientes para estudos estruturais e funcionais, que são fundamentais para os ensaios da fase clínica.

A escolha de um sistema apropriado para a expressão de uma determinada proteína é fundamental para viabilizar a obtenção do produto com integridade funcional e em larga escala. Proteínas que apresentam um enovelamento complexo, com a presença de pontes dissulfeto e glicosilações, requerem sistemas de expressão que sejam capazes de realizar essas modificações pós-traducionais (CREGG et al., 2000).

O sistema mais prático, de baixo custo e simples manutenção é o sistema em bactéria *E.coli*. Porém, em bactérias as proteínas expressas são acondicionadas em corpos de inclusão, sendo necessários processos adicionais de solubilização com agentes desnaturantes e enovelamento das proteínas. Esses ensaios adicionais podem levar à perda da atividade da proteína recombinante. Além disso, bactérias não realizam algumas modificações pós-traducionais, que podem ser importantes para a ação das toxinas (HOFINGER et al., 2007).

Bactérias como a *E. coli* não são capazes de realizar modificações pós-traducionais. Esse é um dos motivos que faz com que a *P. pastoris* possua vantagens na expressão de toxinas. Além disso, a *P. pastoris* possui o gene AOX1 (promotor de álcool oxidase 1) induzível pela adição de metanol, que está conjugado com o peptídeo sinal de *Saccharomyces cerevisiae*. Isso permite que a proteína expressa seja secretada para o meio, facilitando sua purificação (LI, 2011).

Os sistemas de expressão em leveduras, como a *Pichia pastoris*, combinam a fácil manipulação genética e o crescimento rápido à capacidade de promover muitas das modificações pós-traducionais realizadas por células eucarióticas superiores, como processamento proteolítico, enovelamento, formação de pontes dissulfeto e glicosilações de proteínas. Esses sistemas também são capazes de secretar as proteínas expressas, o que representa uma vantagem deste sistema na expressão heteróloga de proteínas (CREGG et al., 2000; CEREGHINO; CREGG, 2000).

A escolha do sistema de expressão em *P. pastoris* pode garantir o sucesso da produção de toxinas recombinantes, uma vez que esse sistema é capaz de realizar o enovelamento correto do peptídeo, com a formação das pontes dissulfeto, para assegurar que a atividade biológica seja preservada (ESCOUBAS et al., 2003; ESTRADA et al., 2007).

Mendes et al. (2008) produziram a Ts1 recombinante em *E.coli*. Apesar disso, devido a seu ambiente oxidante no citoplasma, o organismo não foi capaz de realizar as pontes dissulfeto necessárias para a atividade farmacológica da toxina e as mesmas foram liberadas em corpos de inclusão. Dessa forma, os autores utilizaram as formas não tóxicas recombinantes, Ts1 (1) e Ts1 (2), para imunizar animais a fim de produzir um soro mais específico para o tratamento dos acidentes.

Com relação à expressão em *Pichia pastoris* podemos citar alguns exemplos de toxinas de escorpiões já expressas, como a toxina LqHIT2 do escorpião *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (LI e XIA, 2008); os peptídeos analgésicos semelhantes à BmK Ang M1 do escorpião chinês *Buthus martensii* Karsch (YANG et al., 2009) e peptídeos antimicrobianos semelhante às cecropinas (NIU et al., 2008; QUINTERO-HERNÁNDEZ, 2011).

Anangi (2012) expressaram as toxinas margatoxin (MgTx) and agitoxin-2 (AgTx2) dos escorpiões *Centruroides margaritatus* e *Leiurus quinquestriatus hebraeus* em *Pichia pastoris*. Segundo os autores, ambas as toxinas já tinham sido expressas em *E.coli* e com as funções preservadas, porém em *Pichia pastoris* o rendimento foi de 6-8 vezes maior. As toxinas expressas demonstraram bloquear com elevada potência os canais Kv 1.1 e Kv1.3 de ratos e também inibiram a proliferação de linfócitos T humanos.

No nosso laboratório, diversas toxinas já foram expressas nesse sistema com sucesso, como a serinoprotease da serpente *Crotalus durissus collilineatus*, a Ts19 Frag-II e a hialuronidase do escorpião *T. serrulatus* (BOLDRINI-FRANCA et al., 2015).

Embora os PAMs (peptídeos antimicrobianos) possam causar desestabilizações nas membranas de microrganismos, muitos desses peptídeos têm sido expressos em organismos como a *P. pastoris*. Um dos motivos é que um dos vetores mais utilizados possuem o promotor AOX, induzido por metanol. A expressão que contém esse promotor se dá em duas fases: uma de formação da biomassa, onde ocorre o aumento da densidade celular e a outra de indução da expressão, na presença de metanol. Dessa forma, pode haver uma vantagem na produção de PAMs já que a formação de biomassa ocorre antes da sua expressão, evitando assim uma possível toxicidade à célula hospedeira (PARACHIN et al., 2012; XIAO et al., 2017).

Como exemplos de PAMs produzidos com sucesso em *P. pastoris* estão algumas defensinas humanas, cecropinas da *Musca domestica*, proteínas antifúngicas do *Aspergillus giganteus*, entre outros (PARACHIN et al., 2012).

Apesar das vantagens do sistema de expressão heteróloga em *Pichia pastoris*, sabe-se que podem ser encontrados diferentes tipos de proteases no cultivo. Essas podem ser ligadas às células de *Pichia* ou secretadas pelas mesmas após condições de estresse, que incluem a presença do metanol, deficiência de nutrientes no meio de cultivo (principalmente bases nitrogenadas) e presença de componentes tóxicos (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

A presença de proteases no meio de cultivo pode comprometer a produção das proteínas, já que as mesmas se tornam instáveis ou degradadas. Mesmo que a maioria dessas enzimas esteja presente em vacúolos, a lise celular pode liberá-las e interferir no rendimento e produção da proteína recombinante (LI et al., 2007).

Para que um determinado gene possa ser expresso em um organismo heterólogo é preciso que o mesmo seja clonado em um vetor de expressão. Para isso, é necessária a obtenção da sequência de nucleotídeos, seja a partir de clones da biblioteca de cDNA ou deduzida a partir da sequência de proteínas correspondentes às toxinas escolhidas.

Biblioteca de cDNA (DNA complementar) é um conjunto de vários cDNAs clonados, que representa a fração de RNA mensageiro (mRNA) de uma célula ou tecido em um tempo específico. A biblioteca de cDNA do *T. serrulatus* foi construída a partir da extração da glândula de peçonha do escorpião e envolveu etapas comuns a todas as bibliotecas de abordagem tradicional de cDNA: síntese do cDNA a partir do RNA total pela reação com a transcriptase reversa; amplificação por reação em cadeia da polimerase; purificação do DNA; ligação em vetor de clonagem; transformação em células bacterianas (*E. coli* competentes); amplificação dos plasmídeos da biblioteca e, por fim, sequenciamento

dos clones obtidos e análise das sequências obtidas por programas de bioinformática (WALKER, RAPLEY., 2002; AMORIM, 2015).

A partir da biblioteca de glândulas de escorpiões do gênero *Tityus*, como *T. stigmurus* (BATISTA et al. 2007), *T. discrepans* (D'SUZE et al., 2009) e *T. serrulatus* (AMORIM et al. 2015), foi possível observar que as peçonhas dessas glândulas possuem inúmeros componentes como os peptídeos que atuam em canais para Na^+ e K^+ ; peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs); metaloproteases; peptídeos antimicrobianos (AMPs); hipotensinas, incluindo enzimas, como fosfolipases e hialuronidases.

A utilização da biblioteca de cDNA para obtenção de sequências que codificam toxinas representa uma ferramenta promissora para produção em larga escala de componentes da peçonha de difícil purificação, porém com alto potencial biotecnológico. O nosso grupo de pesquisa já possui uma biblioteca de cDNA da glândula de peçonha do *T. serrulatus*, o que viabiliza a realização de muitos trabalhos futuros (AMORIM, 2015).

Além da clonagem molecular tradicional, onde é feita a ligação do gene amplificado obtido da biblioteca com um vetor de expressão, atualmente tem sido utilizado o desenho de genes sintéticos a partir das sequências obtidas da biblioteca.

Os genes sintéticos são produzidos quimicamente, sem que seja necessária a utilização de um DNA molde. Para isso basta que a sequência de nucleotídeos seja deduzida a partir da sequência da proteína. O desenho de genes sintéticos tem sido uma alternativa muito utilizada frente às dificuldades encontradas no processo de clonagem molecular tradicional, já que os sintetizados são desenhados com sítios de restrição específicos facilitando o processo de ligação ao vetor de expressão (RICHARDSON et al., 2006).

Qualquer sequência pode ser sintetizada, inclusive sequências não encontradas na natureza. Os genes sintéticos têm revolucionado a pesquisa científica. Vacinas, por exemplo, são agora rapidamente desenvolvidas através da síntese de um material genético identificado de um genoma viral, além de novas enzimas anticâncer, entre outros (HUGHES et al., 2011).

Muitas vezes, a taxa de expressão de uma proteína em um organismo é baixa. Isso pode ocorrer porque existe uma variação na frequência de utilização de códons entre diferentes espécies, ou seja, os códons usuais ou frequentes na tradução de genes expressos na *Pichia pastoris* (organismo escolhido para expressão neste trabalho) podem ser diferentes dos do organismo que originaram as toxinas (*Tityus serrulatus*). Por esse motivo, é recomendável fazer a otimização dos códons no desenho dos genes sintéticos. Isso é feito alterando os

códons pelos mais usuais no organismo que a proteína será expressa, sem que a sequência de aminoácidos final seja alterada (RICHARDSON et al., 2006).

Além disso, o vetor pPICZ α A escolhido neste trabalho contém uma sequência que codifica 6 aminoácidos de histidina à proteína final. Esses aminoácidos auxiliam na purificação das proteínas expressas, já que colunas específicas que contêm níquel imobilizado na fase estacionária permitem a interação da proteína expressa com a coluna e, conseqüentemente, sua purificação. Porém, a desvantagem com relação à adição desses aminoácidos (histidinas) é que eles podem alterar a atividade de determinadas proteínas ou peptídeos e serem imunogênicos (KOSOBOKOVA et al., 2016).

A região de poli-histidina pode ser adicionada tanto no C- quanto no N-terminal da proteína. Porém, para fins terapêuticos recomenda-se que essas regiões sejam removidas, já que podem causar uma reação imune em organismo humano. Dessa forma, uma boa alternativa é adicionar a região de poli-histidina no N-terminal e incluir entre ela e a proteína uma sequência que codifique pequenas porções que possam ser hidrolisadas por endopeptidases posteriormente, obtendo-se assim o produto semelhante ao natural (KOSOBOKOVA et al., 2016).

Com isso, no presente trabalho foram selecionadas duas toxinas com potencial biotecnológico e farmacológico (Ts8 e a Ts8-propeptídeo), que tiveram as sequências obtidas a partir dos clones da biblioteca de cDNA construída anteriormente em nosso laboratório.

Essas toxinas foram selecionadas para o presente trabalho por bloquearem canais específicos para potássio, tornando-se promissores alvos de estudo, bem como por possuírem atividades diferenciadas de acordo com a literatura, como atividade antimicrobiana e antiparasitária.

Neste trabalho foram expressas as toxinas em *P. pastoris* a partir da construção dos genes sintéticos inseridos no vetor pPICZ α A. Durante as expressões, diferentes condições foram otimizadas e o estudo eletrofisiológico de um fragmento da rTs8 foi realizado.

Além disso, foram realizadas as purificações das toxinas nativas para serem usadas nos estudos comparativos das atividades funcionais das toxinas recombinantes. Este estudo é pioneiro na produção dessas duas toxinas recombinantes em *Pichia pastoris*, bem como na avaliação de ambas (nativas e recombinantes) em suas atividades funcionais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Visto que não foi possível clonar as toxinas Ts8 e Ts8-propeptídeo (*scorpine-like*) tendo como DNA molde os clones obtidos da biblioteca de *T. serrulatus*, optou-se pelo desenho de um gene sintético das toxinas para expressão em *Pichia pastoris*.

A expressão tanto da rTs8 quanto da rTs8-propeptídeo foi possível, porém observou-se que as toxinas estavam sofrendo degradação proteolítica por diferentes proteases da *P.pastoris*. Dessa forma optamos por modificar diferentes parâmetros da expressão, como a adição de casaminoácidos, inibidores de proteases, diminuição do pH e temperatura a fim de otimizarmos a expressão das toxinas.

A mudança dos parâmetros revelou que a degradação proteolítica foi minimizada com a adição de casaminoácidos e inibidores de proteases no tempo de 24 h, sugerindo a adição desse substrato para minimizar a ação proteolítica de produtos de degradação de *P. pastoris*. Já os outros parâmetros avaliados não demonstraram diferença na expressão dos produtos.

Além disso, pela análise dos produtos de degradação proteolítica obtidos, foi possível identificar que a *Pichia* produz proteases do tipo tripsina, subtilisinas e termolisinas no meio de cultivo.

Foi realizado também um estudo eletrofisiológico pela técnica de *voltage-clamp* de dois microelétrodos com a rTs8. Essa análise foi realizada durante o doutorado sanduiche no Laboratório de Toxicologia supervisionado pelo Prof. Dr. Jan Tytgat, na Universidade Católica de Leuven, na Bélgica. Verificou-se que a e a rTs8 foi capaz de bloquear os canais para potássio do tipo Kv 1.1 e Kv 1.3.

Através da espectrometria de massas, foi possível confirmar que a Ts8 bem como a Ts8-propeptídeo nativas estão na fração VIIIB da primeira etapa cromatográfica em CM-celulose-52 e que foi possível obter a Ts8 pura através da fase reversa da fração VIIIB.

Com relação às atividades funcionais, observou-se que fragmentos das toxinas recombinantes e nativas não induziram citotoxicidade nas células de macrófagos alveolares de murinos. Apesar disso, fragmentos da rTs8 (rTs8 pico 4 e pico 8) e rTs8-propeptídeo pico 3 induziram a liberação de TNF- α , bem como a peçonha bruta. A Ts8 e Ts8+Ts8-propeptídeo nativas induziram a liberação de IL-1 β e a Ts8+Ts8-propeptídeo também induziu a liberação de NO pelos macrófagos alveolares. Esses estudos contribuem para a elucidação de mecanismos da peçonha e avaliação da citotoxicidade dos compostos.

Foi realizada ainda a atividade antimicrobiana dos produtos de expressão e das toxinas nativas. Demonstrou-se que as toxinas não possuem atividade antimicrobiana para *E.coli* nas concentrações testadas. Por outro lado, todas as toxinas, nativas e recombinantes, exceto a rTs8 p4, inibiram o crescimento de *P. pastoris*. Isso explica em grande parte a ação proteolítica sofrida pelas toxinas recombinantes durante o processo de expressão, já que são toxinas com atividade antifúngica. Outro fato que contribui para a proteólise dos produtos recombinantes é a sequência de aminoácidos dessas toxinas, já que possuem um N-terminal exposto.

Esse trabalho foi pioneiro na expressão heteróloga das toxinas rTs8 e rTs8-propeptídeo, bem como na avaliação da liberação de citocinas induzida pelas toxinas e de suas atividades antimicrobianas. Além disso, o presente trabalho contribuiu significativamente para o conhecimento sobre a expressão em *Pichia pastoris*, pelos estudos realizados com mudanças em diferentes parâmetros de expressão heteróloga, bem como na caracterização das proteases presentes neste fungo e seus sítios de clivagem.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

- AHMAD, M. et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 98, n. 12, p. 5301-17, 2014.
- 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, 119 p. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.
- ANANGI, R. et al. Recombinant expression of margatoxin and agitoxin-2 in *Pichia pastoris*: an efficient method for production of KV1.3 channel blockers. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52965, 2012.
- ARANTES, E. C. et al. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. **Toxicon**, v. 27, n. 8, p. 907-16, 1989.
- AYED, A. et al. High level production and purification of human interferon alpha2b in high cell density culture of *Pichia pastoris*. **Enzyme Microb Technol**, v. 42, n. 2, p. 173-80, 2008.
- 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.
- BERGERON Z.L.; BINGHAM J-P. Scorpion toxins specific for potassium (K⁺) channels: a historical overview of peptide bioengineering. **Toxins**, v. 4, n. 11, p.1082-119, 2012.
- BERTAZZI, D. T. et al. Activation of the complement system and leukocyte recruitment by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Int Immunopharmacol**, v. 5, n. 6, p. 1077-84, 2005.
- BOLDRINI-FRANÇA, J. **Expressão e caracterização de uma protease de interesse biotecnológico clonada da glândula de peçonha de *Crotalus durissus terrificus***. 2013, 117p. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.
- BOLDRINI-FRANCA, J. et al. Expression of a new serine protease from *Crotalus durissus collilineatus* venom in *Pichia pastoris* and functional comparison with the native enzyme. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, n. 23, p. 9971-86, 2015.

- BORDON K.C.F., COLOGNA C.T., ARANTES E.C. Scorpion venom research around the world: *Tityus serrulatus*. In: Gopalakrishnakone P., Possani L.D., Schwartz E.F., Rodríguez de la Vega R.C., ed. **Scorpion Venoms**. Dordrecht: Springer Netherlands; 2015. p. 411-438.
- BOSMANS, F.; TYTGAT, J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins. **Toxicon**, v. 49, n. 2, p. 142-58, 2007.
- 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.
- CATTERALL, W. A. et al. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon**, v. 49, n. 2, p. 124-41, 2007.
- CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Rev**, v. 24, n. 1, p. 45-66, 2000.
- CERNI, F. A. et al. Isolation and characterization of Ts19 Fragment II, a new long-chain potassium channel toxin from *Tityus serrulatus* venom. **Peptides**, v. 80, p. 9-17, 2016.
- CERNI, F. A. et al. Electrophysiological Characterization of Ts6 and Ts7, K⁺ Channel Toxins Isolated through an Improved *Tityus serrulatus* Venom Purification Procedure. **Toxins**, v. 6, n. 3, p. 892-913, 2014.
- CHEN, Z. Y. et al. Hg1, Novel Peptide Inhibitor Specific for Kv1.3 Channels from First Scorpion Kunitz-type Potassium Channel Toxin Family. **J Biol Chem**, v. 287, n. 17, p. 13813-21, 2012.
- CHIPPAUX, J.P. Emerging options for the management of scorpion stings. **Drug Design Development Therapy**, v.6, p.165–173, 2012.
- COLOGNA, C. T. et al. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. **Protein Pept Lett**, v. 16, n. 8, p. 920-32, 2009.
- CONDE, R. et al. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. **FEBS Lett**, v. 471, n. 2-3, p. 165-8, 2000.
- CORDEIRO, F. A. et al. Arachnids of medical importance in Brazil: main active compounds present in scorpion and spider venoms and tick saliva. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 21, p. 24, 2015.

CREGG, J. M. et al. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Mol Cell Biol**, v. 5, n. 12, p. 3376-85, 1985.

CREGG, J. M. et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Mol Biotechnol**, v. 16, n. 1, p. 23-52, 2000.

CREGG, J. M. et al. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Mol Cell Biol**, v. 9, n. 3, p. 1316-23, 1989.

CREMONEZ, C. M. et al. Structural and Functional Elucidation of Peptide Ts11 Shows Evidence of a Novel Subfamily of Scorpion Venom Toxins. **Toxins**, v. 8, n. 10, 2016.

CUPO, P., AZEVEDO-MARQUES, M., HERING, S. In: *Animal Peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*, Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad Jr, V. Eds; Sarvier, São Paulo, 2003; p.198-208.

CUPO, P. Clinical update on scorpion envenoming. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 48, n. 6, p. 642-9, 2015.

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. 1010-9, 2009.

DALY, R.; HEARN, M. T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **J Mol Recognit**, v. 18, n. 2, p. 119-38, 2005.

DAUPLAIS, M. et al. On the convergent evolution of animal toxins - Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 7, 1997.

DAVE, K.; LAHIRY, A. Conotoxins: Review and Docking Studies to determine potentials of Conotoxin as an Anticancer Drug Molecule. **Curr Top Med Chem**, v. 12, n. 8, p. 845-51, 2012.

DEGRAY, G. et al. Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. **Plant Physiology**, v. 127, n. 3, p. 852-862, 2001.

DIEGO-GARCIA, E. et al. Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of beta-KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 1, p. 187-200, 2008.

DOYLE, D. A. et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. **Science**, v. 280, n. 5360, p. 69-77, 1998.

EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **Eur J Biochem**, v. 1, n. 1, p. 80-91, 1967.

ESCOUBAS, P. et al. Recombinant production and solution structure of PcTx1, the specific peptide inhibitor of ASIC1a proton-gated cation channels. **Protein Science**, v. 12, n. 7, p. 1332-1343, 2003.

ESTRADA, G. et al. Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin CssII: Heterologous expression and proper folding in vitro. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1770, n. 8, p. 1161-1168, 2007.

FANG, W. et al. Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes. **Science**, v. 331, n. 6020, p. 1074-7, 2011.

FEITOSA, V.A. **Produção de fragmento recombinante de anticorpo em *Pichia pastoris***. 2014, 82p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo. Universidade de São Paulo.

FLORES-SOLIS, D. et al. Solution structure and antiparasitic activity of scorpine-like peptides from *Hoffmanniadrurus gertschi*. **FEBS Lett**, v. 590, n. 14, p. 2286-96, 2016.

GONZÁLEZ, C. et.al. K⁺ Channels: Function-Structural Overview. **Comprehensive Physiology**, Bathesta, v. 2, p. 2087-2149, 2012.

GRANIER, C. et al. IMMUNOCHEMICAL PROPERTIES OF SCORPION ALPHA-TOXINS. In: LIMA, M.E.de et al. **Animal Toxins: State of the Art**; Perspectives in Health and Biotechnology. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2009. p. 123-136.

GREEN, K. et al. Nitrate biosynthesis in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.78, n.12, p. 7764-7768, 1981.

GRIZEL, A. V.; GLUKHOV, G. S.; SOKOLOVA, O. S. Mechanisms of Activation of Voltage-Gated Potassium Channels. **Acta Naturae**, v. 6, n. 4, p. 10-26, 2014.

GUILHELMELLI, F. et al. Activity of Scorpion Venom-Derived Antifungal Peptides against Planktonic Cells of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* Biofilms. **Front Microbiol**, v. 7, p. 1844, 2016.

- 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, n. 9, p. 1784-94, 2013.
- HARRISON, P. L. et al. Antimicrobial peptides from scorpion venoms. **Toxicon**, v. 88, p. 115-37, 2014.
- HIGGINS, D. R.; CREGG, J. M. Introduction to *Pichia pastoris*. **Methods Mol Biol**, v. 103, p. 1-15, 1998.
- HILT, W.; WOLF, D. H. Stress-Induced Proteolysis in Yeast. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 17, p. 2437-2442, 1992.
- HOFINGER, E. S. 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. 444-53, 2007.
- HONG, F.; MEINANDER, N. Q.; JONSSON, L. J. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 438-449, 2002.
- HUGHES, R. A.; MIKLOS, A. E.; ELLINGTON, A. D. Gene synthesis: methods and applications. **Methods Enzymol**, v. 498, p. 277-309, 2011.
- INAN, M. et al. Optimization of temperature-glycerol-pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 7, p. 438-445, 1999.
- ISLAS, L. D. Functional diversity of potassium channel voltage-sensing domains. **Channels**, v. 10, n. 3, p. 202-213, 2016.
- JAHC, M. et al. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. **Journal of Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 45-53, 2003.
- JEON, M. et al. Elevated IL-1 β expression induces invasiveness of triple negative breast cancer cells and is suppressed by zerumbone. **Chem Biol Interact**, v. 258, p. 126-33, 2016.
- KALAPOTHAKIS, E. et al. Screening of expression libraries using ELISA: identification of immunogenic proteins from *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venom. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 679-85, 2001.

KAVRAN, J. M.; LEAHY, D. J. Silver staining of SDS-polyacrylamide gel. **Methods Enzymol**, v. 541, p. 169-76, 2014.

KEIL, B. **Specificity of proteolysis**. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-NewYork, 335p. 1992.

KOBAYASHI, K. et al. High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. **J Biosci Bioeng**, v. 89, n. 1, p. 55-61, 2000.

KOSOBOKOVA, E. N.; SKRYPNIK, K. A.; KOSORUKOV, V. S. Overview of Fusion Tags for Recombinant Proteins. **Biochemistry-Moscow**, v. 81, n. 3, p. 187-200, 2016.

LAROCHE, Y. et al. High-level secretion and very efficient isotopic labeling of tick anticoagulant peptide (TAP) expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Biotechnology (N Y)**, v. 12, n. 11, p. 1119-24, 1994.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. NELSON, D.L.; COX, M.M. Ed: Sarvier, São Paulo, 5ed. 2010.

LEGROS, C. et al. Evidence for a new class of scorpion toxins active against K⁺ channels. **Febs Letters**, v. 431, n. 3, p. 375-380, 1998.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 10, p. 790-802, 2003.

LEWIS, R. J. Conotoxin venom peptide therapeutics. **Adv Exp Med Biol**, v. 655, p. 44-8, 2009.

LI, H.; XIA, Y. [Expression, antiserum preparation and bioactivity assays of insect neurotoxin LqhIT2]. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 24, n. 10, p. 1761-7, 2008.

LI, P. et al. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 142, n. 2, p. 105-24, 2007.

LI, Y. Self-cleaving fusion tags for recombinant protein production. **Biotechnol Lett**, v. 33, n. 5, p. 869-81, 2011.

LIMA, P. C. et al. Partial purification and functional characterization of Ts19 Frag-I, a novel toxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 21, p. 49, 2015,

- MACAULEY-PATRICK, S. et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249-70, 2005.
- MAINI, R. N. et al. Monoclonal anti-TNF alpha antibody as a probe of pathogenesis and therapy of rheumatoid disease. **Immunol Rev**, v. 144, p. 195-223, 1995.
- MARCUSSI, S., ARANTES, E.C.; SOARES, A.M. Escorpiões: **Biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas**. In: Biologia. FUNPEC-Editora, São Paulo, 2011, 140p.
- MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. et al. Production of active, insect-specific scorpion neurotoxin in yeast. **FEBS**, v. 223, n. 2, p. 637-645, 1994.
- MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. et al. Potassium channel blockers from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* (Lutz and Mello, 1922). **Toxicon**, v. 119, p. 253-265, 2016.
- MENDES, T. M. et al. Effective *Tityus serrulatus* anti-venom produced using the Ts1 component. **Toxicon**, v. 52, n. 7, p. 787-93, 2008.
- 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.
- MOUHAT, S. et al. Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 24, p. 2503-18, 2008.
- NI, Z. H. et al. Decrease of hirudin degradation by deleting the KEXI gene in recombinant *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2008.
- NIU, M. F. et al. The molecular design of a recombinant antimicrobial peptide CP and its in vitro activity. **Protein Expression and Purification**, v. 57, n. 1, p. 95-100, 2008.
- ORTIZ, E. et al. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. **Toxicon**, v. 93, p. 125-35, 2015.
- PARACHIN, N. S. et al. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. **Peptides**, v. 38, n. 2, p. 446-56, 2012.

- PEIGNEUR, S. et al. A gamut of undiscovered electrophysiological effects produced by *Tityus serrulatus* toxin 1 on Na-V-type isoforms. **Neuropharmacology**, v. 95, p. 269-277, 2015.
- PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 48, p. 29987-29990, 1997.
- PESSINI, A. C. et al. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1495-504, 2001.
- PESSINI, A. C. et al. Mediators involved in the febrile response induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Toxicon**, v. 48, n. 5, p. 556-66, 2006.
- PETRICEVICH, V. L.; LEBRUN, I. Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions in vitro. **Mediators Inflamm**, v. 2005, n. 1, p. 39-49, 2005.
- PIMENTA, A. M. C. et al. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, n. 17, p. 1562-1572, 2001.
- POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. S. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 91-105, 2012.
- 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. 326-36, 2014.
- PUCCA, M. B. et al. Immunosuppressive evidence of *Tityus serrulatus* toxins Ts6 and Ts15: insights of a novel K⁺ channel pattern in T cells. **Immunology**, v. 147, n. 2, p. 240-250, 2016.
- PUCCA, M. B. et al. *Tityus serrulatus* venom - A lethal cocktail. **Toxicon**, v. 108, p. 272-284, 2015.
- PUCCA, M. B. et al. Ts8 scorpion toxin inhibits the Kv4.2 channel and produces nociception in vivo. **Toxicon**, v. 119, p. 244-52, 2016.
- PUKRITTAYAKAMEE, S. et al. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 629-37, 1988.

QUINTERO-HERNANDEZ, V. et al. Scorpion venom components that affect ion-channels function. **Toxicon**, v. 76, p. 328-42, 2013.

RICHARDSON, S. M. et al. GeneDesign: Rapid, automated design of multikilobase synthetic genes. **Genome Research**, v. 16, n. 4, p. 550-556, 2006.

RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C.; POSSANI, L. D. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. **Toxicon**, v. 43, n. 8, p. 865-75, 2004.

ROGOWSKI, R. S. et al. Tityustoxin K-Alpha Blocks Voltage-Gated Noninactivating K⁺ Channels and Unblocks Inactivating K⁺ Channels Blocked by Alpha-Dendrotoxin in Synaptosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 4, p. 1475-1479, 1994.

SALAMIN, K. et al. Secretion of an endogenous subtilisin by *Pichia pastoris* strains GS115 and KM71. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 13, p. 4269-76, 2010.

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal Biochem**, v. 166, n. 2, p. 368-79, 1987.

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 20 de março de 2017.

SHI, X. Z. et al. Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 28, n. 2, p. 321-330, 2003.

SIEZEN, R. J.; LEUNISSEN, J. A. M. Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases. **Protein Science**, v. 6, n. 3, p. 501-523, 1997.

SINAN. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinanet/animaisp/bases/animaisbrnet.def.>>> Acesso em: 30 de março de 2017.

SINHA, J. et al. Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon-T. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, n.1, p. 102-112, 2004.

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. 252-61, 2009.

SIREN, N. et al. Production of recombinant HIV-I Nef (negative factor) protein using *Pichia pastoris* and a low-temperature fed-batch strategy. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 44, p. 151-158, 2006.

SMART, S. L. et al. Deletion of the K(V)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice. **Neuron**, v. 20, n. 4, p. 809-19, 1998.

SPENCER, R. H.; CHANDY, K. G.; GUTMAN, G. A. Immunological identification of the Shaker-related Kv1.3 potassium channel protein in T and B lymphocytes, and detection of related proteins in flies and yeast. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 191, n. 1, p. 201-6, 1993.

SWARTZ, K. J. Towards a structural view of gating in potassium channels. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 12, p. 905-16, 2004.

VAN DEN HAZEL, H. B.; KIELLAND-BRANDT, M. C.; WINTHER, J. R. Review: biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. **Yeast**, v. 12, n. 1, p. 1-16, 1996.

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. Moving Pieces in a Venomic Puzzle: Unveiling Post-translationally Modified Toxins from *Tityus serrulatus*. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 7, p. 3460-3470, 2013.

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

WANKE, E.; RESTANO-CASSULINI, R. Toxins interacting with ether-a-go-go-related gene voltage-dependent potassium channels. **Toxicon**, v. 49, n. 2, p. 239-48, 2007.

WERTEN, M. W. T.; DE WOLF, F. A. Reduced proteolysis of secreted gelatin and Yps1-mediated alpha-factor leader processing in a *Pichia pastoris* kex2 disruptant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2310-2317, 2005.

WULFF, H.; CASTLE, N. A.; PARDO, L. A. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 12, p. 982-1001, 2009.

WULFF, H.; ZHOROV, B. S. K⁺ channel modulators for the treatment of neurological disorders and autoimmune diseases. **Chem Rev**, v. 108, n. 5, p. 1744-73, 2008.

XIAO, S. et al. Peroxisome-targeted and tandem repeat multimer expressions of human antimicrobial peptide LL37 in *Pichia pastoris*. **Prep Biochem Biotechnol**, v. 47, n. 3, p. 229-235, 2017.

XIE, J. et al. Angiostatin production in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* fed with mixed carbon sources. **Biotechnol Lett**, v. 25, n. 2, p. 173-7, 2003.

XIE, S. et al. Identification of a new specific Kv1.3 channel blocker, Ctri9577, from the scorpion *Chaerilus tricostatus*. **Peptides**, 2012.

YAGI, Y.; SHIINA, T. Recent advances in the study of chloroplast gene expression and its evolution. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 2014.

YANG, J. L. et al. [Optimization on the production of analgesic peptide from *Buthus martensii* Karsch in *Pichia pastoris*]. **Yao Xue Xue Bao**, v. 44, n. 1, p. 91-4, 2009.

YU, F. H.; CATTERALL, W. A. Overview of the voltage-gated sodium channel family. **Genome Biol**, v. 4, n. 3, p. 207, 2003.

YUAN, C. H. et al. Discovery of a distinct superfamily of Kunitz-type toxin (KTT) from tarantulas. **PLoS One**, v. 3, n. 10, e3414, p.1-15, 2008.

ZHANG, B.; SHANMUGARAJ, B.; DANIELL, H. Expression and functional evaluation of biopharmaceuticals made in plant chloroplasts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 38, p. 17-23, 2017.

ZHANG, Y. W.; LIU, R. J.; WU, X. Y. The proteolytic systems and heterologous proteins degradation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Annals of Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 553-560, 2007.

ZHAO, Y. et al. Toxins Targeting the Kv1.3 Channel: Potential Immunomodulators for Autoimmune Diseases. **Toxins (Basel)**, v. 7, n. 5, p. 1749-64, 2015.

ZHU, S. Y. et al. MeuTXK beta 1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 4, p. 872-883, 2010.

ZOCCAL, K. F. et al. *Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. **Toxicon**, v. 57, n. 7-8, p. 1101-8, 2011.

ZUBERI, S. M. et al. A novel mutation in the human voltage-gated potassium channel gene (Kv1.1) associates with episodic ataxia type 1 and sometimes with partial epilepsy. **Brain**, v. 122 (Pt 5), p. 817-25, 1999.