Milena de Mello Campos Leinmuller

**Expressão de Crotamina
Recombinante em *Escherichia coli***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2016

Milena de Mello Campos Leinmuller

**Expressão de Crotamina
Recombinante em *Escherichia coli***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a. Irina Kerkis

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço
de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Mello Campos Leinmuller, Milena
Expressão de Crotamina Recombinante em
Escherichia coli / Milena de Mello Campos
Leinmuller; orientador Irina Kerkis. -- São Paulo,
2016.
109 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Crotalus durissus terrificus*. 2. Crotamina.
3. Expressão. 4. Citoplasma . 5. Periplasma. I.
Kerkis, Irina, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Milena de Mello Campos Leinmuller

Título: Expressão de Crotamina Recombinante em *Escherchia coli*

Orientador(a): Irina Kerkis.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

.....

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

.....

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

.....

Nome:

Instituição:

Dedico este trabalho a Deus em primeiro lugar;

Aos meus pais, Carmen e Paulino que são responsáveis pela minha mais importante formação;

A minha irmã Marina pelo apoio e cumplicidade.

Agradecimentos

À minha orientadora Dra. Irina Kerkis por ter me dado a oportunidade de conhecer e executar a pesquisa e por ter me permitido trabalhar no Laboratório de Genética;

Ao Dr. Álvaro Rossan de Brandão Prieto da Silva por toda paciência, dedicação e por todo aprendizado que me possibilitou ter;

À Bárbara (Obrava com Obelhas) por ter me ajudado com desenvolvimento deste trabalho;

À Celine (Cececis) por todo apoio, ajuda e sugestões concedida a este trabalho. Sou muito grata por tudo;

Aos meus amigos do Laboratório de Genética: André (Gato), André (Zaka), Allan (Fofa e “melhores” piadas), Cris, Damiana, Dener (ou Denis?), Diana (a mais bonita), Eduardo (DuLindo), Gustavo (Cumpris), Leandro (Panda), Lisley (Excelência), Jéssica, Marcelly (Gordinha), Marília, Nicole, Paulo (Popo) e Vivi (Sofrência). Por toda amizade construída ao longo dos anos, por todos os momentos dentro e fora do laboratório, pelo incentivo e risadas sem fim.

À Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias e a Dra. Rosa Chura-Chambi do centro de Biotecnologia – IPEN – USP, por ter cedido seu laboratório para a realização de alguns experimentos;

À Dra. Patricia Antonia Estima Abreu de Aniz, do Laboratório de Bacteriologia – Instituto Butantan, por ter aberto o seu laboratório e permitido o uso de alguns aparelhos;

À Dra. Nancy Oguiura do Laboratório de Ecologia e Evolução – Instituto Butantan por ter cedido gentilmente o anticorpo anti-crotamina;

Ao Dr. Eduardo Brandt da Faculdade de Medicina – USP – Ribeirão Preto por ter cedido gentilmente a crotamina purificada.

A todos os funcionários do laboratório de Genética: Alexandre Pereira, Ana Paula, Angelina, Fátima, Fátima (Guima), Fagundes, Mirtes, Neno, Ronaldo, por manterem o laboratório organizado.

Ao Instituto Butantan por fornecer toda a infraestrutura para realizar este trabalho;

A Agencia de Fomento CAPES pelo auxilio financeiro.

*O Homem é a mais insana das espécies.
Adora um Deus invisível e mata uma
Natureza visível, sem perceber que a
Natureza que ele mata é esse Deus que
ele adora!*

(Hubert Reeves)

Resumo

LEINMULLER, M. M. C. **Expressão de Crotamina Recombinante em *Escherichia coli***. 2016. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Os venenos de serpentes contêm uma mistura complexa de toxinas (proteínas e enzimas) que destroem os processos bioquímicos ou fisiológicos da presa. A crotamina é um dos principais componentes do veneno da cascavel Sul Americana *Crotalus durissus terrificus*. Essa proteína pertence à família dos polipeptídeos miotóxicos de baixo peso molecular (SBMPs). Uma importante atividade da crotamina é a habilidade de penetrar rapidamente em células proliferamente ativas, podendo ser usada como nanocarreadora, levando DNA plasmidial e drogas para dentro de células tumorais. Outra atividade interessante desta toxina é a indução de morte celular dose dependente em células cancerígenas proliferamente ativas sem prejudicar células normais, demonstrando promissora atividade anticâncer. A crotamina apresenta forte atividade antifúngica e moderada atividade contra procariotos, age bloqueando canais de potássio dependente de voltagem, sendo seletiva para os canais $K_v1.1$, $K_v1.2$ e $K_v1.3$, e induz paralisia dos membros posteriores de camundongo. Dada a importância das atividades da crotamina, a toxina foi usada para produzir na forma recombinante. De forma geral, as toxinas animais são peptídeos secretados para o lúmen da glândula de veneno e são ricos em pontes dissulfeto, comumente expressas em sistemas procarióticos na forma de corpúsculos de inclusão ou em sistemas de expressão periplasmática. Foram construídos três genes sintéticos, um para a expressão em citoplasma e dois para a expressão em periplasma bacteriano utilizando o vetor pRSET-A (Invitrogen®). Para a expressão de crotamina em citoplasma bacteriano, a região do DNA que codifica a região do peptídeo maduro foi clonada em fusão com uma cauda simples de 6 x His separada por uma sequência codificante do sítio de clivagem de enterokinase em substituição à proteína de fusão do vetor comercial pRSETA. Para a expressão em periplasma a região codificante da crotamina madura foi clonada sob o controle da sequência sinal da OmpA de *E. coli*. Todos os códons raros da crotamina madura foram otimizados de acordo com os códons preferenciais de *E. coli*. Em uma das construções para a expressão em periplasma, além da crotamina madura, o peptídeo sinal de OmpA também teve seus códons raros otimizados. Os plasmídeos desenhados para a expressão da crotamina madura em citoplasma e periplasma foram transformados em bactéria competente BL21(DE3) e BL21-AI e a indução da proteína foi feita por IPTG e arabinose, respectivamente. A expressão foi analisada por SDS-PAGE e Western Blotting, mostrando que foi possível expressar as três construções em BL21-AI.

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus*. Crotamina. Expressão. Citoplasma. Periplasma.

Abstract

LEINMULLER, M. M. C. **Expression of Recombinante Crotamine in *Escherichia coli***. 2016. 109 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Snake venoms contain a complex cocktail of toxins (proteins and enzymes) which disrupt physiological or biochemical processes of the prey. Crotamine is one of the major components present in the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. It belongs to the small basic myotoxins peptide – SBMPs. An important activity of crotamine is the ability to rapidly penetrate proliferative cells, acting as a nanocarrier, carrying plasmid DNA and drugs into tumor cells. Another interesting activity of this toxin is the ability to promote cell death of actively proliferating cancer cells in a dose dependent manner. Crotamine shows strong antifungal activity and modest activities against prokaryotes, it acts by blocking voltage-dependent potassium channels being selective for channels Kv1.1, Kv1.2 e Kv1.3 and inducing paralysis of the hind limbs of mice. Given the importance of the activities of crotamine, the toxin was chosen for production in the recombinant form. Generally, animal toxins are peptides secreted into the lumen of the venom gland and are rich in disulfide bridges. When expressed in prokaryotic system, animal toxins are commonly found in the form of inclusion bodies. They can also be expressed in periplasmic system. Three synthetic genes were constructed, one for expression in the cytoplasm and two for expression in the bacterial periplasm using pRSET-A (Invitrogen®) system. For cytoplasm expression, the DNA region encoding the mature peptide was cloned in fusion with a 6 x His tag separated by a site. For expression in the periplasm, the mature crotamine coding region was cloned in fusion with *E. coli* OmpA signal sequence. All crotamine and OmpA signal peptide rare codons were optimized according to *E. coli* preferred codon usage. The plasmids designed for crotamine expression in periplasm and cytoplasm have been transformed in strains BL21(DE3) and BL21-AI were used as hosts, and the induction of recombinant protein was done by IPTG and arabinose, respectively. The induced culture products were analyzed by SDS-PAGE and Western Blot, showing that it was possible to express the three constructs in BL21-AI.

Key words: *Crotalus durissus terrificus*. Crotamine. Expression. Cytoplasm. Periplasm.

Lista de Ilustrações

Figura 01 – Órgão termorregulador fosseta loreal.....	24
Figura 02 – Porcentagem de sequências de toxinas encontradas no veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> após análise proteômica	26
Figura 03 – Sequência da crotamina madura.....	27
Figura 04 – Alinhamento das sequências dos SBPM das cascavéis Norte e Sul americanas.....	28
Figura 05 – Representação do cDNA da crotamina.....	30
Figura 06 – Alinhamento dos precursores da crotamina e crotasin.....	31
Figura 07 – Estrutura tridimensional da crotamina.....	32
Figura 08 – Efeito biológico da crotamina.....	34
Figura 09 – Peptídeos minimizados da crotamina.....	36
Figura 10 – Vetor comercial pRSET-A Invitrogen®	47
Figura 11 – Substituição do peptídeo sinal da crotamina pelo peptídeos sinal de OmpA.....	50
Figura 12 – Códon Otimizados nas construções para expressão de crotamina no periplasma.....	51
Figura 13 – Construção do cassete de expressão para o citoplasma.....	52
Figura 14 – Ensaio Dot Blot.....	60
Figura 15 – Cepas bacterianas utilizadas para expressão de crotamina recombinante.....	66
Figura 16 – Vetor resultante para expressão de crotamina recombinante em citoplasma.....	68
Figura 17 – Vetor resultante para expressão de crotamina recombinante em periplasma.....	71
Figura 18 – Extração dos plasmídeos da bactéria competente TOP10 (Miniprep).....	72
Figura 19 – Dupla digestão enzimática dos plasmídeos contendo o inserto de crotamina.....	73
Figura 20 – Expressão de pRSET-A Cro x BL21(DE3).....	75
Figura 21 – Concentração do anticorpo primário após redução da reatividade cruzada.....	77

Figura 22 – Expressão dos vetores pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro em BL21-AI.....	78
Figura 23 – Expressão de BL21-AI x pRSET-A Opt OmpA Cro.....	80
Figura 24 – Comparação do sistema pRSET com o sistema pET.....	82
Figura 25 – Sequenciamento do plasmídeo construído para expressão de crotamina em citoplasma pRSET-A Cro	85
Figura 26 – Sequenciamento do plasmídeo construído para expressão de crotamina em periplasma pRSET-A OmpA Cro	86
Figura 27 – Sequenciamento do plasmídeo construído para expressão em periplasma pRSET-A Opt OmpA Cro.....	87
Figura 28 – Expressão do vetor pRSET-A Cro x BL21-AI	88

Lista de tabelas

Tabela 01 – Lista de medicamentos aprovados pelo FDA.....	39
Tabela 02 – Códon preferenciais de <i>Escherichia coli</i>	48

Lista de Abreviatura e Sigla

3' UTR	do inglês <i>untranslated region</i> (região não traduzida)
5' UTR	do inglês <i>untranslated region</i> (região não traduzida)
ACE	do inglês <i>angiotensin converting enzyme</i> (enzima conversora de angiotensina)
AMPs	do inglês <i>antimicrobial peptides</i> (peptídeos antimicrobianos)
Bla	do inglês <i>beta-lactamase</i> (betalactamase)
BSA	do inglês <i>bovine serum albumin</i> (albumina bovina)
C ⁻	Crotamina negativa
C ⁺	Crotamina positiva
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAP	do inglês <i>cationic antimicrobial peptides</i> (peptídeos antimicrobianos catiônicos)
Ca _v	Canal de cálcio
CPP	do inglês <i>cell penetrating peptide</i> (Peptídeo penetrante celular)
CTX-3	do inglês <i>Cardiotoxin 3</i> (cardiotoxina 3)
DMSO	do inglês <i>dimethyl sulfoxide</i> (dimetilsulfóxido)
DNA	do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DO	Densidade Óptica
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-ácético)
EK	Sítio de clivagem por enteroquinase
EtBr	do inglês <i>ethidium bromide</i> (brometo de etídeo)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	Força G
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide 1</i> (peptídeo tipo glucagon)
GOR ⁻	do inglês <i>glutathione reductase</i> (glutathiona redutase)
HCl	Ácido clorídrico
HIS	Cauda de histidina
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>

IB	do inglês <i>inclusion body</i> (corpúsculo de inclusão)
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
KCl	Cloreto de potássio
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio dibásico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
K _v	Canal de potássio
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
MCS	do inglês <i>multiple cloning site</i> (sítio múltiplo de clonagem)
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mRNA	do inglês <i>messenger ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico mensageiro)
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
Na _v	Canal de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NMR	do inglês <i>nuclear magnetic resonance</i> (ressonância magnética nuclear)
NrTPs	do inglês nucleolar translocating peptides (peptídeos de translocação nucleolar)
OmpA	do inglês <i>Outer Membrane Protein A</i> (proteína de membrana externa A)
PBS	do inglês <i>phosphate buffer solution</i> (solução tampão de fosfato)
PEG	do inglês <i>polyethylene glycol</i> (polietilenoglicol)
PIPES	<i>Piperazine-n n'-bis 2-ethanesulfonic acid</i>
RBS	do inglês <i>ribosome binding site</i> (sítio de ligação do ribossomo)
RNA	do inglês <i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RPM	Rotação por minuto
SBMPs	do inglês small basic myotoxin peptides (polipeptídeos miotóxicos de baixo peso molecular)
SDS	do inglês <i>sodium dodecyl sulfate</i> (dodecil sulfato de sódio)
SDS-PAGE	do inglês <i>sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel eletrophoresis</i> (dodecil sulfato de sódio eletroforese em gel de poliacrilamida)
ShK	<i>Stichodactyla helianthus</i>
TAE	do inglês <i>Tris acetate-EDTA buffer</i> (tampão Tris acetato-EDTA)

TE	Tris-EDTA
TB	Meio de cultura <i>Terrific Broth</i>
TBS	do inglês <i>tris-buffered saline</i> (tampão tris-salina)
TRX	do inglês <i>thioredoxin reductase</i> (tioredoxina redutase)
TSS	do inglês transformation storage solution (solução de transformação e estoque)
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Genero Crotalus: Evolução	21
2.2 Veneno e Peçonha Ofídica	23
2.2.1 Veneno Crotálico	25
<u>2.2.1.1 Crotamina</u>	27
<u>2.2.1.2 Atividades Biológicas da Crotamina</u>	33
2.3 Toxinas como Potencial Biotecnológico	37
2.4 Produção de proteína recombinante em <i>Escherichia coli</i>	39
3 OBJETIVO	45
3.1 Objetivos Específicos	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Estratégia de Clonagem	46
4.1.1 Construção do cassete de expressão para produção de crotamina no Periplasma	48
4.1.2 Construção do cassete de expressão para produção de crotamina no Citoplasma	51
4.2 Preparo de Bactérias competentes TOP10 pelo método de Cloreto de Cálcio (CaCl₂)	52
4.3 Transformação dos plasmídeos em bactéria TOP10 e plaqueamento	53
4.4 Extração dos plasmídeos pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro da bactéria TOP10	54
4.5 Eletroforese em gel de Agarose 1,2%	55
4.6 Dupla Digestão Enzimática dos plasmídeos pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro	55
4.7 Expressão de pRSET-A Cro x BL21(DE3)	56
4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE	57
4.9 Western Blotting	57
4.10 Redução da reatividade cruzada do anticorpo	58
4.11 Dot Blot	59
4.12 Preparo de bactéria competente pelo método 1x TSS	61
4.13 Transformação da bactéria competente BL21-AI com os plasmídeos pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro, pRSET-A Opt OmpA Cro	61
4.14 Expressão de BL21-AI utilizando os plasmídeos pRSET-A Cro, pRSETA OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro	61
4.15 Análise da Expressão com diferentes tempos de indução e temperatura	62
4.16 Sequenciamento	63

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 Estratégia de Clonagem.....	65
5.2 Construção do vetor pRSET-A Cro para expressão de crotamina no citoplasma de <i>E.coli</i>	66
5.3 Construção dos vetores pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt Omp Cro para produção de crotamina no periplasma de <i>E.coli</i>.....	69
5.4 Extração dos plasmídeos pRSET-A Cro,pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro em TOP10	72
5.5 Dupla Digestão Enzimática dos plasmídeos pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro contendo o inserto de crotamina.....	73
5.6 Expressão de pRSET-A Cro x BL21(DE3)	74
5.7 Redução da reatividade cruzada do anticorpo anti-crotamina e Dot Blot.....	75
5.8 Expressão em BL21-AI utilizando os plasmídeos pRSET-A Cro, pRSETA OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro.....	77
<i>5.8.1 Expressão dos vetores pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro, pRSET-A Opt OmpA Cro em cepa bacteriana BL21-AI com diferentes tempos de indução e temperatura</i>	<i>79</i>
5.9 Problemas com instabilidade na expressão da crotamina recombinante	81
6 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

As serpentes constituem um grupo de répteis bem sucedidos em termos de história evolutiva. São encontradas em quase todo o mundo e habitam regiões temperadas e tropicais.

As serpentes venenosas pertencem a duas famílias Viperidae e Elapidae. As cascavéis pertencem à família Viperidae, subfamília Crotalinae e gênero *Crotalus*. Elas possuem presas responsáveis pela inoculação do veneno um mecanismo de inoculação de veneno muito sofisticado (WÜSTER et al., 2008)

O veneno de animais é composto por um arsenal de toxinas que desencadeiam respostas fisiológicas e bioquímicas específicas (KORDIS; GUBENSEK, 2000). As proteínas que compõem os venenos animais são responsáveis por imobilizar paralisar e matar presas (KORDIS; GUBENSEK, 2000).

O veneno animal representa um reservatório natural de moléculas biologicamente ativas, sendo uma mistura complexa de centenas de toxinas peptídicas que demonstram excelentes propriedades farmacológicas e são altamente estáveis devido às suas estruturas tridimensionais incomuns. Essas estruturas tridimensionais envolvem padrões complexos de pontes dissulfeto que é uma ligação covalente simples resultante da junção de dois grupos tiol (-SH). Estudos recentes à imobilização da presa. Os conhecimentos sobre toxinas estão evoluindo rapidamente e, atualmente, muitas toxinas são usadas como agentes terapêuticos, como por exemplo, Captopril, Ziconotide, Exenatide e Batroxobin, além do mais outras toxinas naturais estão ainda em pesquisa e desenvolvimento (CALVETE, 2009; CASEWELL, 2013; HAYASHI; 2008).

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* é de interesse do nosso grupo. Este veneno evidencia quatro principais frações contendo as toxinas majoritárias do veneno: Convulxina, Giroxina, Crotoxina e Crotamina, sendo que a última é o objetivo de estudo do presente trabalho.

Dentro dessas frações majoritárias do veneno, a crotamina pode estar ou não presente ou em menor quantidade (BOLDRINI-FRANÇA, 2010; SCHENBERG, 1959), ou seja, a crotamina é uma toxina que apresenta variações geográficas intraespecíficas com populações crotamina positiva e crotamina negativas bem

definidas (OGUIURA, 2005). Além disso, a quantidade de crotamina encontrada no veneno bruto varia de 0 a 5% quando comparada com crotoxina, que corresponde a 90% do peso seco do veneno bruto.

A crotamina é uma miotoxina presente no veneno da cascavel Sul Americana *Crotalus durissus terrificus*. Essa toxina é um peptídeo catiônico e possui 42 aminoácidos (LAURE, 1975). Sua estrutura secundária é composta por uma α -hélice e duas folhas β interligadas por 3 pontes dissulfeto (FADEL et al., 2005). As pontes dissulfeto permitem que as moléculas tornem-se mais compactas e estáveis.

Dados de nosso laboratório demonstraram a capacidade célula penetrante da crotamina (KERKIS et al., 2004). Esse peptídeo se compartimentaliza em organelas celulares principalmente lisossomo, núcleo e nucléolo de células proliferamente ativas, tendo seletividade principalmente por células tumorais (KERKIS et al., 2010). De maneira dose dependente, a crotamina é citotóxica para células tumorais especialmente CHO-K1 e B16F10 (HAYASHI et al., 2008). A crotamina é capaz de inibir o crescimento de melanomas *in vivo* (PEREIRA et al., 2011) e tem a capacidade de marcar a região metastática do tumor, diferenciando o tecido tumoral do normal, demonstrando assim sua propriedade antitumoral e de biomarcador (PEREIRA et al., 2011). Também se demonstrou que fragmentos minimizados de crotamina são capazes de penetrar membranas celulares carreando outras moléculas, como por exemplo, vetores de DNA (NASCIMENTO et al., 2007), ou enzimas (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011, 2013). Por fim estudos recentes demonstram que crotamina e seus peptídeos minimizados atuam seletivamente internalizando em classes específicas de células relacionadas ao sistema imune (LEE et al., 2016; RODRIGUES et al., 2013). Outra atividade que a crotamina apresenta é o bloqueio de canal de potássio dependente de voltagem, sendo seletiva para os canais do tipo *shaker* $K_v1.1$, $K_v1.2$ e $K_v1.3$ (PEIGNEUR et al., 2012).

Uma vez que a crotamina possui atividades biológicas importantes, seria biotecnologicamente interessante ter um sistema eficiente para sua produção. É importante ressaltar que a crotamina possui patente, o que impede sua comercialização não licenciada, mesmo sendo produzida por outros grupos (YAMANE. Use of crotamine, kit and composition, 2006). Para produzir crotamina

recombinante foi utilizado o sistema de expressão heteróloga em *Escherichia coli*, pois a única fonte de crotamina é a forma natural, porém sua quantidade no veneno é muito pequena, então uma alternativa para sua produção é na forma sintética ou recombinante.

A bactéria Gram negativa *Escherichia coli* é o sistema de expressão usado para produção de proteínas recombinantes devido a sua genética bem caracterizada (BANEYX, 1999). A capacidade de produzir mutantes de crotamina permitirá estudar seus sítios de ligação em relação a diversos alvos moleculares e celulares.

Por se tratar de uma toxina de eucarioto o princípio mais adequado para expressar a proteína recombinante seria um sistema de expressão eucariótico, porém a manipulação desse sistema é mais complexa, há menos vetores disponíveis, o rendimento é menor e o custo é muito elevado. Além do mais, dependendo da concentração e acúmulo no núcleo celular, a crotamina provavelmente seria citotóxica para uma célula eucariótica.

É importante observar que o grupo de Vu et al., (2014) conseguiu produzir crotamina solúvel bioativa utilizando a cauda de fusão MBP (*Maltose Binding Protein*) em *Escherichia coli*. A proposta do nosso trabalho é verificar se é possível produzir a proteína com uma curta cauda de fusão na região N-terminal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura é de extrema importância, pois contribui para a evolução do conhecimento do tema abordado.

2.1 Genero *Crotalus*: Evolução

A família Viperidae é composta por 340 espécies de serpentes venenosas distribuídas pelos continentes Americanos, África, Europa e Ásia (www.reptile-database.org acessado em 12/09/16). Essas serpentes possuem presas retráteis

localizadas em uma maxila móvel responsáveis pela inoculação do veneno (WÜSTER, 2008).

Dentro da família Viperidae são reconhecidas quatro subfamílias: Azemiopinae, Causinae, Viperinae e Crotalinae (WÜSTER et al., 2008). As cascavéis são serpentes que pertencem à subfamília Crotalinae sendo reconhecidos dois gêneros *Crotalus* e *Sistrurus* (HOSER, 2009).

Uma nova classificação para este grupo foi proposta por Hoser (2009), porém, os atuais conhecimentos filogenéticos não são suficientes para tal mudança (WÜSTER; BÉRNILS, 2011). Além do mais, alguns estudos revelaram que a subfamília Crotalinae é um grupo monofilético (PAKINSON, 1999).

A subfamília Crotalinae apresenta ampla distribuição, suas espécies são encontradas no Velho e Novo mundo (CASTOE; PARKINSON, 2006). Estudos sobre a biogeografia dessas serpentes sugerem que o grupo Crotalinae foi originado na Ásia em direção a América do Norte (CASTOE; PARKINSON, 2006; WÜSTER et al., 2008). Wüster et al., (2008) sugerem uma colonização da subfamília Crotalinae no fim do período Oligoceno e início do Mioceno,

A origem e dispersão do gênero *Crotalus* para a América do Sul é proposta por três eventos: A elevação dos Andes no final do período Terciário; a elevação do Istmo do Panamá acima do nível do mar e uma série de flutuações climáticas ocorrendo no final do período Plioceno e Pleistoceno (WÜSTER et al., 2005).

As cascavéis dispersaram da América do Norte em direção a América do Sul (WÜSTER et al., 2005, 2008) após o surgimento do Istmo do Panamá cerca de 2 – 1,5 milhão de anos (QUIJADA-MASCAREÑAS; WÜSTER, 2006; WÜSTER et al., 2005).

Com a elevação do Istmo do Panamá e o surgimento das regiões de savana, as cascavéis conseguiram ocupar rapidamente o continente sul americano em um curto espaço de tempo, dispersando também para a floresta amazônica a aproximadamente um milhão de anos atrás (QUIJADA-MASCAREÑAS; WÜSTER, 2006).

Hoje, dentro da subfamília Crotalinae pode-se encontradas muitos gêneros e espécies (www.reptile-database.org acessado em 12/09/16). No Novo Mundo, essas espécies são localizadas desde o sul do Canadá até na Patagônia na Argentina (HOSER, 2009).

No Brasil, há uma única espécie que representa o gênero *Crotalus*, essa espécie é a cascavél neotropical *Crotalus durissus*, que amplamente distribuída pelo país (WÜSTER et al., 2005). Sete subespécies de *Crotalus durissus* são reconhecidas no Brasil, as subespécies encontradas com maior frequência são: *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* e *Crotalus durissus collilineatus*.

- *Crotalus durissus terrificus* encontrada desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais;
- *Crotalus durissus cascavella* encontrada desde o Maranhão até o norte de Minas Gerais;
- *Crotalus durissus collilineatus* distribuída entre Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e São Paulo;
- *Crotalus durissus dryinas* encontrada no Amapá e Costa Norte das Guianas;
- *Crotalus durissus marajoensis* encontrada na Ilha de Marajó;
- *Crotalus durissus ruruima* distribuída em algumas regiões de Roraima, Amapá, Para, Amazonas e Roraima;
- *Crotalus durissus trigonicus* encontrada em Roraima; (www.reptile-database.org acessado em 12/09/16).

Na América do Sul, há bastantes casos de acidentes ofídicos envolvendo as cascavéis neotropicais, o tratamento indicado para esses tipos de acidentes é a imunização das vítimas através do soro anti-ofídico. Para alcançar melhorias no tratamento é necessário compreender a biologia e evolução dessas espécies (QUIJADA-MASCAREÑAS; WÜSTER, 2006), pois a composição de seus venenos é bastante variável o que pode influenciar na eficácia do antiiveneno e no tratamento de vítimas (FRY et al., 2003).

2.2 Veneno e Peçonha Ofídica

As serpentes são consideradas os animais peçonhentos com melhor sistema de inoculação de veneno, sendo esse sistema sofisticado, eficiente e diverso (JACKSON, 2003). Para esse sistema de inoculação de veneno ser eficiente, durante a evolução, foi necessário ocorrer uma série de mudanças morfológicas na glândula de veneno tornando-a altamente complexa (JACKSON, 2003).

Uma das principais funções do veneno é a captura de presas. (CASEWELL et al., 2013). Durante o processo de envenenamento as proteínas e enzimas presentes no veneno iniciam o processo de digestão da presa (KORDIS; GUBENSEK, 2000). Para localizar suas presas, as serpentes venenosas utilizam um órgão sensorial denominado fosseta loreal, um orifício localizado entre os olhos e a narina (Figura 1) (KROCHMAL; BAKKEN, 2003). Além da detecção de presas, as fossetas loreais também são utilizadas para explorar o ambiente e auxiliar na termorregulação (KROCHMAL; BAKKEN, 2003; BAKKEN; KROCHMAL, 2007).

Figura 1 – Órgão termorregulador Fosseta loreal localizado entre o olho e narina.

De forma geral, o veneno pode ser definido como compostos bioativos produzidos e armazenados por glândulas especializadas localizada na região pós orbital (CASEWELL et al., 2013; JACKSON, 2007). Essas glândulas estão envolvidas por uma musculatura que comprime a glândula de veneno no momento da picada conduzindo o veneno através de presas retráteis e tubulares (VONK et al., 2008).

A maioria dos venenos animais são misturas complexas de componentes bioativos, compreende uma mistura de proteínas, peptídeos, enzimas e compostos não enzimáticos (ESCOUBAS; KING, 2009; FRY, 2009, 2012).

A produção de veneno em serpentes parece resultar em um custo metabólico elevado (McCUE, 2006). Para minimizar esse gasto de energia, acredita-se que algumas cascavéis injetam o veneno na presa de acordo com o seu tamanho (HAYES, 1995).

O recrutamento de toxinas para glândula de veneno ocorreu através de um processo denominado nascimento e morte de proteínas (*birth and death model*) (NEI

et al., 1997). O recrutamento, geralmente, envolve proteínas ancestrais, no qual o gene da proteína é duplicado e a cópia deste gene passa a ser expressa na glândula de veneno (FRY, 2005; KORDIS; GUBENSEK, 2000).

O evento de duplicação gênica resulta em famílias de toxinas que exibem uma variedade de atividades funcionais (FRY et al., 2008), mas também muitos eventos de duplicação gênica podem tornar o gene não funcional ou o gene pode ser deletado do genoma (NEI et al., 1997).

Algumas famílias de toxinas podem ter sofrido o processo inverso denominado recrutamento reverso de proteínas, ocorrendo da seguinte forma, proteínas presentes na glândula de veneno voltam a desempenhar papéis fisiológicos em tecidos glandulares não venenosos (CASEWELL et al., 2012).

2.2.1 Veneno Crotálico

O veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* é composto por uma mistura de substâncias, como as toxinas: Crotoxina, Giroxina, Convulxina e Crotamina (ALEXANDER et al., 1988) tem ação neurotóxica, miotóxica, altera a coagulação do sangue e pode provocar insuficiência renal aguda.

As toxinas presentes no veneno da *C. d. terrificus* pertencem às seguintes famílias de toxinas: fosfolipase A₂ (PLA₂), serino proteases, 5' nucleotidases, metaloproteinases, fator de crescimento neural, fosfodiesterase e glutaminilciclase (GEORGIEVA, 2009) e lectinas do tipo C, como pode ser observado na figura 2.

Figura 2 – Porcentagem de seqüências de toxinas encontradas no veneno de *Crotalus durissus terrificus* após análise proteômica (adaptado de Georgieva et al., 2009).

A crotoxina pertence a família de toxinas fosfolipase A₂ e é encontrada em grande quantidade no veneno (90% do peso seco) (GEORGIEVA et al., 2009). A crotoxina é uma neurotoxina de ação pré-sináptica, que atua nas terminações nervosas, inibindo a liberação de acetilcolina e causando paralisia muscular (GOPALAKRISHNAKONE; HAWGOOD, 1984).

A giroxina é uma proteína que pertence ao grupo das serino – proteases (GEORGIEVA et al., 2009). Algumas serino – proteases do veneno de serpente afetam importantes funções fisiológicas como: coagulação sanguínea, fibrinólise, agregação plaquetária e sistema nervoso. A giroxina tem atividade do tipo trombina convertendo o fibrinogênio diretamente em fibrina. O consumo do fibrinogênio pode levar à incoagulabilidade sangüínea. Geralmente, não há redução do número de plaquetas. As manifestações hemorrágicas, quando presentes, são discretas (ALEXANDER, et al., 1988; SEKI, et al., 1980).

A convulxina é uma toxina presente no veneno da serpente *C. d. terrificus* e pertence à família de toxinas Lectinas – tipo C (GEORGIEVA et al., 2009). É um potente ativador de plaquetas humanas, ligando predominantemente na glicoproteína VI (GPVI) (JANDRO-PERRRUS et al., 1988).

A Crotamina pertence à família de polipeptídeos miotóxicos básicos de baixo peso molecular (*Small basic myotoxin polypeptides*-SBMPs) e não apresentam atividades enzimáticas, o que as distingue da classe de outras miotoxinas básicas, tal como fosfolipases A₂ de veneno. Outra toxina encontrada nessa família de proteínas é a miotoxina α . Proteínas que fazem parte dessa família são responsáveis por causar mionecrose durante o envenenamento (BIEBER; NEDELKOV, 1997).

2.2.1.1 Crotamina

A crotamina é um peptídeo catiônico composto por 42 aminoácidos incluindo 11 aminoácidos básicos, sendo que 9 são lisinas e 2 são argininas (LAURE, 1975). Sua massa molecular é de 4883.82 Da (PEIGNEUR et al., 2012). Esses aminoácidos básicos fornecem à molécula cargas altamente positivas, consequentemente, a crotamina possui um ponto isoelétrico experimental de 10.3 (Figura 3).

Figura 3 – Sequência da crotamina madura. Mostrando o arranjo das pontes dissulfeto e a composição da estrutura secundária (α -hélice e folhas β).

A crotamina foi primeiramente observada no veneno da cascavel argentina *Crotalus durissus terrificus* por Gonçalves; Polson (1947). Esta toxina extremamente básica foi encontrada no veneno de outras cascavéis da região Sul do Brasil (GONÇALVES; VIEIRA, 1950).

No veneno de cascavel existe um polimorfismo individual da crotamina (GONÇALVES, 1956), Schenberg (1959) atribuiu essa característica à distribuição geográfica da serpente. Outros estudos revelaram que também há variações geográficas em miotoxinas de cascavéis norte-americanas (STRAIGHT, 1991).

Outras toxinas que pertencem a família SBMP foram isoladas do veneno de outras espécies de cascavéis, por exemplo a miotoxina α do veneno de *Crotalus viridis viridis* (OWNBY, 1976), miotoxina I e II de *Crotalus viridis concolor* (BIEBER et al., 1987), peptídeo C de *Crotalus viridis heleri* (MAEDA et al., 1978) e CAM-toxina de *Crotalus adamanteus* (SAMEJIMA et al., 1987), crotamina Ile-19 de *Crotalus durissus ruruima* (SANTOS et al., 1993) e toxina E de *Crotalus horridus horridus* (ALLEN et al., 1996), e foi verificado que existe um alto grau de homologia entre os aminoácidos das toxinas dessa família (OGUIURA, 2005). A figura 4 mostra o alinhamento de toxinas similares à crotamina.

MYC2_CRODU	1	YKQCHKKGGHCFPKEKICLPSSDFGKMDCRWRWKCCCKKSGS-----	42
MYX_CRODR	1	YKQCHKKGGHCFPKEKICLPSSDFGKMDCRWRWKCCCKKSGS-----	42
MYX4_CRODU	1	YKQCHKKGGHCFPKEKICLPSSDFGKMDCRWRWKCCCKKSGK-----	43
MYX1_CRODU	1	YKRCHIKGGHCFPKEKICLPSSDFGKMDCPWRRKCCCKKSGS-----	42
MYX1_CROVV	1	YKQCHKKGGHCFPKEKICLPSSDLGKMDCRWKWKCCCKKSGS-----	42
MYX_CROAD	1	YKRCHKKGGHCFPKTVICLPSSDFGKMDCRWRWKCCCKKGSVNNAISI	48
MYXC_CROOH	1	YKRCHKKGGHCFPKTVICLPSSDFGKMDCRWKWKCCCKKGSVNNAISI	48
MYX1_CROOO	1	YKRCHKKGGHCFPKTVICLPSSDFGKMDCRWKWKCCCKKGSVN-----	43
MYX2_CROOO	1	YKRCHKKGGHCFPKEKICTPSSDFGKMDCRWKWKCCCKKGSVN-----	43
1801364A	1	YKRCHKKGGHCFPKTVICLPSSDFGKMDCRW--KCCCKKGSVNNA---	43
		:* ** * *** ** *****:***** * ***** *	

Figura 4 – Alinhamento das sequências maduras dos peptídeos miotóxicos de baixo peso molecular (SBPM) das cascavéis Norte e Sul americanas. MYC2_CRODU (Crotamina) *Crotalus durissus terrificus*, MYX_CRODR (Crotamina Ile-19) *C. durissus ruruima*, MYX4_CRODU (Miotoxina 4) *C. durissus terrificus*, MYX1_CRODU (Miotoxina 1) *C. durissus terrificus*, MYX1_CROVV (Miotoxina α) *C. viridis viridis*, MYX_CROAD (CAM Toxin) *C. adamanteus*, MYXC_CROOH (Toxic peptide C) *Crotalus oreganus helleri*, MYX1_CROOO (Miotoxina I) *Crotalus oreganus concolor*, MYX2_CROOO (Miotoxina II) *Crotalus oreganus concolor*, gij1801364A (Miotoxina) *C. adamanteus*. O asterisco (*) indica a conservação dos aminoácidos e (:) indica forte conservação das propriedades físico-químicas dos resíduos alinhados;. Adaptado de Oguiura et al., 2005.

Ainda que os peptídeos crotamina-*simile* sejam amplamente distribuídos entre as espécies de serpente do gênero *Crotalus* a presença dessa miotoxina no veneno varia de acordo com a região geográfica (SCHENBERG, 1959; STRAIGHT et al., 1991), ou seja, a crotamina pode estar presente ou ausente do veneno de *C. d.*

terrificus. Posteriormente estudos procuraram elucidar essa variação da crotamina em nível molecular e genético.

A ausência da crotamina no veneno está relacionada com a falta de transcrição do mRNA dessa toxina na glandula de veneno, como demonstrado por RÁDIS-BAPTISTA et al., (1999) através do ensaio de Northern Blot. A presença de crotamina no veneno pode variar quanto à concentração, uma possível explicação para isso é o variado número de cópias do gene (OGUIURA, et al., 2009; RÁDIS-BAPTISTA et al., 2003;).

O gene da crotamina é encontrado no braço longo do cromossomo 2. É composto por 3 éxons e 2 íntrons totalizando 1785 nucleotídeos. O primeiro éxon codifica a maior parte do precursor da crotamina, 19 de 22 resíduos de aminoácidos. O segundo éxon codifica os 3 últimos aminoácidos do peptídeo sinal e 39 aminoácidos da toxina madura. O terceiro éxon codifica os 4 aminoácidos remanescentes da crotamina madura e a região não codificante 3' UTR do mRNA (RNA mensageiro) da crotamina contendo o sinal de poliadenilação. Acima do peptídeo sinal encontra-se a região 5' UTR (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2003). A organização do cDNA da crotamina pode ser observada na figura 5.

Figura 5 – Representação do cDNA da crotamina. A cor roxa representa a região 5' UTR, em amarelo a região do peptídeo sinal. A cor laranja representa a crotamina madura, em laranja-claro destaca a excisão da lisina (K) C-terminal. O asterisco indica o codon de terminação (TAA) e a cor verde-claro representa a região 3' UTR. A caixa amarelo-claro indica o sinal de poliadenilação

O gene da crotamina é encontrado somente em serpentes *Crotalus durissus terrificus* crotamina positiva (C⁺), serpentes (C⁻) não apresentam o gene. O número de cópias gênicas varia, e portanto, pode variar a quantidade de crotamina no veneno (OGUIURA et al., 2009).

Análises do DNA genômico tanto de cascavéis C⁺ quanto cascavéis crotamina negativa (C⁻) apresentaram um gene relacionado à crotamina denominado *crotasin* (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2004). Estudos revelaram que ambos os genes possuíam mesma organização genica e a mesma conservação no padrão de cisteínas e similaridade quanto ao peptídeo sinal (Figura 6), mas há apenas 27% de similaridade na estrutura primária da região madura, sugerindo que o crotasin pode adotar uma estrutura similar à própria crotamina, mas apresentar uma atividade completamente diferente (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2004).

Q9PWF3	MYC2_CRODU	1	MKILYLLFAFLFLAFLSEPGNAYKQ	HKKGGH	CFPKEKI	CLPPSSDFGKMD	CRWRWKCC	60
Q6HAA2	CTSP2_CRODU	1	MKILYLLSAFLFLAFLSESGNAQPQ	RWLDGFCHS	--SP	CPSGTTSIGQQD	CLWYESCCI	58
			*****	*****	***	**:	*.*.*	
Q9PWF3	MYC2_CRODU	61	KGSGK					65
Q6HAA2	CTSP2_CRODU	59	PRYEK					63
			*					

Figura 6 – Alinhamento dos precursores da crotamina e crotasin. As sequências foram alinhadas utilizando o programa Clustal Omega (SIEVERS; CLUSTAL OMEGA, 2016). Os códigos de acesso Q9PWF3 MYC2_CRODU indica a sequência do precursor da crotamina e Q6HAA2 CTSP2_CRODU indica a sequência do precursor de crotasin, ambas de *Crotalus durissus terrificus*. Em vermelho está indicado o peptídeo sinal e em verde as cisteínas conservadas que participam da formação de pontes dissulfeto. (*) indica identidade de conservação, (:) indica forte conservação das propriedades físico-químicas dos resíduos alinhados; (.) indica fraca similaridade das propriedades físico-químicas dos resíduos alinhados. Pode-se observar que a conservação se deve principalmente ao peptídeo sinal e aos resíduos de cisteína. Os precursores apresentam 49, 3% de identidade e apenas 26, 7% de identidade na região madura.

Entretanto, não se conhece a função biológica do crotasin e, diferentemente da crotamina, ele não é expresso na glândula de veneno, mas é altamente expresso no pâncreas das serpentes (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2004). Talvez não seja coincidência que seu local de expressão máximo seja o pâncreas que é uma glândula digestiva análoga às glândulas salivares que provavelmente deram origem às glândulas de veneno (KOCHVA, 1987). Outro fator interessante é que o crotasin está presente tanto nas cascavéis C⁺ quanto nas cascavéis C⁻, indicando que esta molécula pode estar relacionada ao ancestral comum atóxico que deu origem ao atual gene da toxina (OGUIURA et al., 2009). Análise dos genes da crotamina e crotasin sugere que ambos são genes parálogos que evoluíram através de evolução acelerado éxon II (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2004).

A crotamina é uma proteína secretada no lúmen da glândula de veneno e, portanto sofre modificações pós-traducionais durante o seu processo de maturação no complexo de Golgi. Essas modificações pós-traducionais são: clivagem do peptídeo sinal concomitante com a excisão da lisina (K) C-terminal (figura 5) (PRIETO DA SILVA et al., 2015) e a formação das 3 pontes de dissulfeto entre as Cys04-Cys36; Cys18-Cys30 e Cys18-Cys37 figura 3 (FADEL et al., 2005)

Devido ao arranjo de suas pontes dissulfeto e a sua estrutura secundária (SIQUEIRA et al., 2002) verificou-se que crotamina tem uma estrutura terciária similar a grupos de peptídeos antimicrobianos classificados como β -defensinas o que pode ser visto na figura 7.

Figura 7 – Estrutura tridimensional da crotamina: a cor vermelha representa a α -hélice; a cor amarela representa as folhas β e em verde a conexão entre as pontes dissulfeto. Esta figura também mostra a semelhança entre a crotamina e a β -defensina humana

A estrutura tridimensional da crotamina (Figura 7) foi determinada por Ressonância Magnética Nuclear (NMR) (FADEL et al., 2005) e cristalografia de raios-X (CORONADO, et al., 2013), que revelou a presença de duas folhas β , uma α -hélice e a posição 6 das cisteínas interligados por três pontes dissulfeto intramoleculares (CORONADO et al., 2013)

As defensinas representam uma das principais famílias de peptídeos antimicrobianos (*Antimicrobial peptides – AMPs*), esses peptídeos exercem um papel fundamental na resposta imune inata (HAZLETT; WU, 2011). O sistema imune inato tem como função de proteger o hospedeiro contra organismos invasores (HAZLETT; WU, 2011).

Os peptídeos AMPs apresentam características em comum, por exemplo, tamanho reduzido, padrão de ligação entre as pontes dissulfeto e massa molar entre 3 – 5 KDa (TAYLOR et. al, 2007). Esses peptídeos possuem aminoácidos carregados positivamente como argininas e lisinas, portanto, tais peptídeos são chamados de peptídeos catiônicos antimicrobianos (*Cationic Antimicrobial Peptide - CAP*) (PUSHPANATHAN et. al, 2013).

Nas β -defensinas a conectividade das pontes dissulfeto é dada da seguinte maneira: $C^I - C^V$, $C^{II} - C^{IV}$, $C^{III} - C^{VI}$ (DHOPE et al., 2006). O mesmo padrão de pontes dissulfeto é observado na crotamina (Figura 3). Apesar de ambas as

proteínas apresentarem similaridade nas suas estruturas terciárias, suas sequências primárias exibem baixa conservação em seus aminoácidos (CORONADO et al., 2013),

Embora, a crotamina apresente estrutura similar às β -defensinas ela não atua com AMP em células procarióticas, mas exibe importante atividade em células eucarióticas, tais como o fungo *Candida albicans* (YOUNT et al., 2009). Yamane et al., (2013) demonstrou uma fraca atividade antimicrobiana em células procarióticas. Corroborando estes dados Oguiura, et al., (2011) e Costa, et al., (2014) relataram que a crotamina desnaturada em sua forma linear, apresenta atividade antimicrobiana apenas contra algumas cepas de *E. coli* isoladas, confirmando que a toxina exibe um estreito espectro de atividades antimicrobianas quando comparado com as atividades de β -defensinas humanas. Portanto, a importante atividade antifúngica da crotamina pode contribuir para o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos (YAMANE et al., 2013).

2.2.1.2 Atividades Biológicas da Crotamina

A crotamina age no tecido muscular causando paralisia espástica dos membros posteriores em camundongos e necrose (Figura 8). Sua LD₅₀ é de 1.5 μ g/g i.v ou 33 μ g/g i.p (LAURE, 1975).

Figura 8 – Efeito biológico da crotamina. Paralisia espástica dos membros posteriores causada pela crotamina (Foto cedida por Dr. Gandhi Rádis-Baptista).

Estudos realizados por Chang e Tseng em 1978 sugeriram que a crotamina induz a despolarização da membrana celular interferindo na corrente de sódio. Entretanto, estudos realizados utilizando várias subunidades de canal de sódio (por exemplo: Na_v 1.1, Na_v 1.2, Na_v 1.3, Na_v 1.4, Na_v 1.5 e Na_v 1.6) demonstraram que a proteína não interfere diretamente nas funções destes canais (RIZZI et. al., 2007), sendo incapaz de bloqueá-los.

Outros estudos realizados utilizando modelagem computacional sugeriram que a crotamina poderia atuar bloqueando canais de potássio dependente de voltagem, esses resultados indicam que este peptídeo interage com aminoácidos específicos no poro do canal (YOUNT et al., 2009). Posteriormente, um estudo realizado por Peigneur et al., (2012) demonstrou que a crotamina age bloqueando canais de potássio dependente de voltagem, sendo seletiva para os canais K_v 1.1, K_v 1.2 e K_v 1.3 e sendo mais potente para este último canal ($IC_{50} = 287 \pm 97$ nM).

Os canais de potássio dependentes de voltagem (K_v) despertam um grande interesse biotecnológico pois podem ser usados como ferramenta para terapia anti-câncer, pois a expressão desses canais estão alteradas em células neoplásicas. (ARCANGELI; BECCHETTI, 2010). Esses canais são super-expressos em câncer de mama, câncer de próstata e melanoma, desta forma o canal K_v 1.3 (PARDO, 2004).

É interessante notar que os canais $K_v1.3$ também desempenham importante papel na ativação de linfócitos T de memória central (WULFF et al., 2007).

Doenças autoimunes como, por exemplo, *Diabetes mellitus*, esclerose múltipla, psoríase e artrite reumatoide podem ser tratadas com o bloqueio do canal de potássio $K_v1.3$ (BEETON et al., 2001). Neste caso, a crotamina poderia também ser utilizada como modelo para tratamento de doenças autoimunes, já que tem seletividade para este canal.

Outra característica interessante da crotamina é sua atividade de peptídeo penetrante celular (*Cell Penetrating Peptide – CPP*). Os CPPs são peptídeos altamente catiônicos de baixo peso molecular, ricos em aminoácidos básicos tais como, arginina e lisina (KERKIS et al., 2006). Peptídeos ricos em resíduos básicos, em geral com caráter anfipático e formados por alfa hélice têm uma capacidade maior de internalização nas células (FUTAKI et al., 2000), frequentemente tal processo é dependente de heparan sulfato (NASCIMENTO et al., 2007).

Os CPPs possuem alta afinidade por membranas lipídicas e transportam de forma eficiente um conjunto de moléculas biologicamente ativas e terapeuticamente relevantes para as células (NASCIMENTO et al., 2007).

Os estudos de Kerkis et al., (2004) demonstraram a internalização da crotamina em diferentes linhagens celulares. Uma vez internalizada, a crotamina é encontrada no espaço perinuclear e no núcleo celular. No núcleo, liga-se aos cromossomos na fase G2/S, quando começa a divisão dos centríolos (KERKIS et al., 2004).

Trabalhos recentes sugerem que a crotamina inibe a proliferação celular de maneira dose dependente em várias células cancerígenas proliferamente ativas, sem prejudicar células normais (KERKIS et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2012; PEREIRA et al., 2011). Estudos *in vivo* com a crotamina indicam que a proteína inibiu o crescimento tumoral em modelo camundongo de melanoma murino *in vivo* (NASCIMENTO et al., 2012).

A crotamina, tal como alguns CPPs, pode ser minimizada em peptídeos lineares menores (Figura 9) que conservam a propriedade de penetrar membranas celulares e que podem ser utilizados como carreadores intracelulares, seja de

biomoléculas poliméricas, drogas, nanopartículas e até mesmo levando DNA para o interior da célula, que podem ser usados para o desenvolvimento de novas tecnologias anticâncer (KERKIS et al., 2004, 2006, 2010; RÁDIS-BAPTISTA et al., 2008, 2011).

Figura 9 – Peptídeos minimizados da crotamina. A figura mostra a sequência primária da crotamina e seu arranjo de pontes dissulfeto (verde). Possíveis sequências de localização nuclear (NLS) estão indicadas por uma caixa amarela. Em baixo se mostra uma representação esquemática da sucessão da estrutura secundária, com a α -hélice indicada em vermelho e as folhas β -pregueadas em amarelo. O alinhamento mostra a posição dos resíduos dos peptídeos lineares minimizados NrTP (rosa) e CyLoP (azul) sendo que os resíduos compartilhados entre ambas as sequências é mostrado em roxo escuro. A estrutura tridimensional da crotamina é mostrada em duas vistas com rotação do eixo centra em 180° e a posição correspondente dos peptídeos minimizados é mostrada nas respectivas cores.

Peptídeos lineares baseados na sequência da crotamina madura foram capazes de manter suas características célula penetrante, mas com diferenças. Assim o CyLoP1 (Cytosol localizing peptide) se acumula exclusivamente no

citoplasma da célula (JHA et al., 2011). Os NrTPs (Nucleolar translocation peptides) por sua vez se acumulam em diversas linhagens celulares e translocam para o núcleo celular marcando nucléolos com alta afinidade (RÁDIS-BAPTISTA, 2012; RODRIGUES et al., 2015). Além de transportar com alta eficiência moléculas marcadoras para o interior da célula o NrTP6 é atóxico e é capaz de translocar para o interior celular enzimas conjugadas até 300 vezes maiores (RODRIGUES et al., 2011).

Uma vez que crotamina tem atividades biológicas tão interessantes, seja como nanocarreador ou pela sua atividade antitumoral intrínseca, seria biotecnologicamente importante ter um sistema eficiente de sua produção. Além disso, os sítios ligantes e de interação da crotamina com seus alvos celulares, como por exemplo, o canal $K_v1.3$ não é conhecido. Ter a possibilidade de produzir crotamina recombinante em um sistema viável possibilitaria a produção de mutantes que poderiam ser utilizados em ensaios de ligação capazes de definir seus sítios funcionais utilizando, por exemplo, técnicas de “alanine scanning” (a técnica consiste em substituir os aminoácidos por alanina para estudar estabilidade e função da proteína)

2.3 Toxinas como Potencial Biotecnológico

No reino animal, os venenos são considerados uma das secreções bioquímicas mais complexas já produzidas (CASEWELL, 2013). As toxinas de veneno apresentam alvos moleculares e mecanismos de ação específicos, dessa forma são usadas como ferramentas farmacológicas para gerar novas drogas e curar doenças (CALVETE, 2009).

As toxinas de serpente, como a Cobratoxina, uma neurotoxina obtida a partir do veneno de *Naja kaouthia*, podem ser usadas para o tratamento da esclerose múltipla. Estudos farmacológicos com esta toxina mostram sua utilização nessa aplicação (REID, 2007).

A descoberta de drogas baseadas em veneno iniciou em 1970 com o desenvolvimento do anti-hipertensivo captopril a partir de um inibidor de ACE

(*Angiotensin Converting Enzyme*) descoberto a partir do veneno da serpente de *Bothrops jararaca* (CUSHMAN; ONDETTI, 1991).

Os diferentes componentes do veneno de serpentes estão sendo utilizados como um agente terapêutico natural contra o câncer (VYAS et al., 2013).

Foi isolado do veneno de *Naja naja atra* uma substância denominada Cardiotoxin-3 (CTX-3), esse peptídeo possui propriedades anticancerígenas (JAIN; KUMAR, 2012). Outro exemplo é a Crotoxina, uma PLA₂ presente no veneno de *Crotalus durissus terrificus* que apresenta atividade citotóxica a uma variedade de células tumorais murinas (CORIN, 1993).

Recentemente, novas drogas têm surgido a partir de venenos animais, por exemplo o medicamento Prialt, usado para tratar dores crônicas, esse medicamento é um equivalente sintético do peptídeo Omega-Conotoxin MVIIA de *Conus Magnum* (MILJANICH, 2004). Outra toxina da saliva do monstro de Gila (*Heloderma suspectum*) denominada Exendin deu origem ao medicamento Byetta, um medicamento utilizado para tratar diabetes tipo 2 (KNOP et al., 2009).

Os componentes do veneno de serpente podem ter outras utilidades. Foi desenvolvido a partir de serino proteases presente no veneno da cascavél Sul Americana *Crotalus durissus terrificus* uma fibrina adesiva que pode ser usada por dentistas para suturar pacientes (BARBOSA et al., 2007; UTKIN, 2015).

Com os avanços em técnicas moleculares para a descoberta de novos compostos derivados do veneno de animais, muitos produtos alcançaram estágios iniciais para ensaios clínicos como o peptídeo sintético SHK-186, um bloqueador do canal de potássio proveniente da anêmona do mar *Stichodactyla helianthus*. Apesar dos avanços em técnicas moleculares, muitos produtos que alcançaram os ensaios clínicos são abandonados, como exemplo o peptídeo CVID uma ômega-conotoxin presente no veneno de *Conus catus*, responsável por bloquear canal de cálcio (HARVEY, 2014). Na tabela 1 encontram-se proteínas ou derivados de proteínas aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para a produção de fármacos a partir de compostos derivados de veneno animal.

Proteína ou derivado	Fonte da proteína do veneno	Alvo molecular	Via de injeção	Indicação	Aprovado pelo FDA	Referência
Captopril (Capoten)	<i>Bothrops jararaca</i>	ACE	Oral	Hipertensão	1981	Cushman & Ondetti, 1991
Eptifibatide (Intergrilin)	<i>Sistrurus miliarius</i>	Receptor de integrina	Intravenosa	Síndromes coronarianas agudas	1998	O'Shea & Tchong, 2002
Tirofibana (Aggrastat)	<i>Echis</i>	Receptor de integrina	Intravenosa	Síndromes coronarianas agudas	1999	Menozi et al, 2005
Bivalirudina (Angiomax)	<i>Hirudo medicinalis</i>	Trombina	Intravenosa	Coagulação durante cirurgia	2000	Warkentin et al, 2008
Ziconitide (Prialt)	<i>Conus magnum</i>	Canal Cav2.2	Intratecal	Dores crônicas	2004	Miljanich, 2004
Exenatide (Byetta)	<i>Heloderma suspectum</i>	Receptor de GLP-1	Subcutâneo	Diabetes tipo 2	2005	Barnett, 2007
Batroxobin (Baqutin)	<i>Bothrops insularis</i> <i>Bothrops atrox</i>	Fibrinogênio	Intravenosa	Sangramento intra operatório	NA	Zhang et al, 2011

Tabela 1 – Medicamentos aprovados pelo FDA. Lista medicamentos aprovados derivados da proteína de venenos animais (adaptado de King, 2011). NA – Não autorizado pelo FDAs utilizado para tratamento de desordem trombótica na China

2.4 Produção de proteína recombinante em *Escherichia coli*

O desenvolvimento da técnica do DNA recombinante abriu uma nova era para produção de proteína para as aplicações em pesquisa e indústria. Uma característica importante desse desenvolvimento é a capacidade de expressar proteínas eucarióticas em bactérias, tal como *Escherichia coli* ou em organismo superior (MARTSON, 1986).

A maioria dos produtos biofarmacêuticos é recombinante. Esses produtos são produzidos na forma recombinante com o auxílio da engenharia de proteínas e genética (DEMAIN; VAISHNAV, 2009; SANCHEZ-GRACIA et al., 2016).

O primeiro passo para a produção de proteína recombinante é escolher o sistema de expressão desejado, hoje em dia existem muitos sistemas de expressão disponíveis como: bactérias, leveduras, fungos; célula de mamífero, insetos, animais e plantas transgênicos (JANA; DEBI, 2005). O segundo passo é clonar o

DNA de interesse e em seguida produzir a proteína em vetor de expressão escolhido (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

Com todos esses sistemas de expressão disponíveis para a produção de proteínas heterólogas, a escolha da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* é a hospedeira geralmente utilizada devido a sua habilidade de crescimento rápido em grandes densidades em substrato de baixo custo, por sua genética ser bem caracterizada, é uma hospedeira de fácil manipulação, há um número cada vez maior de vetores de clonagem e hospedeiros mutantes disponíveis e possui um simples processo em grande escala (BANEYX, 1999; PETI; PAGE, 2007; SAHDEV et al., 2008).

Embora o sistema de expressão em *E. coli* seja amplamente usado para expressão de proteínas recombinantes, não é um sistema muito adequado para produção de proteínas que sofrem modificações pós-traducionais, pois a *E. coli* não é capaz de fazer as mesmas modificações específicas de eucariotos eucariotos (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

A maioria das proteínas de eucarioto possui modificação pós-tradução, assim, o sistema de expressão a princípio mais adequado para expressar proteínas recombinantes eucarióticas seria um sistema de expressão eucariótico. As toxinas de serpentes se encaixam neste caso, além de serem secretadas no Complexo de Golgi, muitas são glicosiladas e fosforiladas (KHOW; SUNTRARACHUM, 2012). Além disso, uma das principais características das toxinas animais é terem inúmeras pontes dissulfeto. As proteínas citoplasmáticas bacterianas não apresentam pontes dissulfeto, exibindo cisteínas livres, isso porque o citoplasma bacteriano tem características redutoras que impedem a formação dessas pontes (CORNELIS, 2000). Os sistemas de expressão eucarióticos são muito importantes para a produção de proteínas recombinantes, porém a manipulação desse sistema é mais complexa, há menos vetores disponíveis, o rendimento é menor e o custo é muito elevado (KHAN, 2013).

Entretanto, no caso da crotamina que é um peptídeo não enzimático sem nenhuma outra modificação pós tradução, exceto a clivagem do peptídeo sinal, a excisão da lisina C-terminal e a correta formação das pontes dissulfeto, seria viável sua expressão em um sistema procariótico, desde que fosse expressa na sua

estrutura nativa e com a correta formação das pontes dissulfeto essenciais para sua estrutura e atividade, sendo que existem sistemas de expressão dirigidos para o periplasma, que é um compartimento de características oxidativas onde as pontes dissulfeto se podem formar corretamente (BANEYX, 1999; MAKRIDES, 1996; SAHDEV et al., 2008). Além disso, existem sistemas procarióticos mutantes (*gor*⁻; *trxB*⁻) cujo citoplasma tem características oxidativas o que permite a formação de pontes dissulfeto nas proteínas recombinantes expressas no citoplasma desses hospedeiros (HATAHET et al., 2014), muitas proteínas são eficientemente produzidas em forma de corpúsculo de inclusão mantendo integral parte de sua estrutura secundária sendo fácil sua renaturação e re-enovelamento com a correta formação de pontes dissulfeto principalmente em sistemas de solubilização e renaturação em alta pressão hidrostática (BALDUINO et al., 2001; CHURA-CHAMBI et al., 2008)

Por estas razões foi utilizado como sistema de expressão a bactéria *Escherichia coli* devido as suas vantagens, versatilidade e facilidade Este sistema é considerado excelente para produção de proteínas que não sofram nenhum tipo de modificação pós – tradução (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

Para produção de proteína heteróloga com formação de pontes dissulfetos, como é o caso da crotamina, é necessário escolher um compartimento adequado para expressão da proteína em *E. coli*. Por exemplo, o citoplasma não seria uma boa opção para produção de proteínas ricas em pontes dissulfeto, pois possui um ambiente redutor devido à presença da tioredoxina redutase e glutathione redutase que mantêm as pontes reduzidas (CORNELIS, 2000). Para melhorar a solubilidade de proteínas heterólogas no citoplasma de bactéria o ideal é expressar essas proteínas em cepas de *E. coli* que sofreram mutações nos genes da tioredoxina redutase (*trxB*⁻) e glutathione redutase (*gor*⁻) (SORENSEN; MORTENSEN, 2005). Expressões de proteínas realizadas nessas cepas mutantes mostrou que nessas condições o citoplasma passa a ter um ambiente oxidativo sem comprometer a viabilidade celular favorecendo assim a formação de pontes dissulfeto (BASSETTE et al., 1999).

Proteínas que seriam super-expressas na forma de corpúsculo de inclusão poderiam ter uma melhor solubilidade modificando o ambiente redox do citoplasma

de *E. coli* (XIONG et al., 2005). Por outro lado, tornaria-se difícil a produção em larga escala de proteínas com múltiplas pontes dissulfeto (XIONG et al., 2005).

A super-expressão de proteínas recombinantes produzidas no citoplasma de cepas normais de *E. coli* geralmente resultam em agregados insolúveis conhecidos como corpúsculo de inclusão (DECHAVANNE et al., 2011; QORONFLEH et al., 2007; SAHDEV et al., 2008). A formação de corpúsculo de inclusão pode ocorrer devido ao desequilíbrio entre solubilização da proteína *in vitro* e agregação (KHOW; SUNTRARACHUN, 2012; SAHDEV et al., 2008), também como a velocidade de tradução, a presença de códons raros, a presença de pontes dissulfeto, a quantidade de proteína expressa e principalmente pela agregação protéica devido à hidrofobicidade da proteína nascente (RUDOLPH; LILIE, 1996).

Mesmo assim, há vantagens em obter a proteína de interesse na forma de corpúsculo de inclusão, pois é fácil de isolar a proteína, minimiza a degradação da molécula alvo e aumenta sua resistência à proteólise, o rendimento é mais elevado e a proteína de interesse é purificada facilmente (SINGH; PANDA, 2005). Além disso, o agregado protéico do corpúsculo de inclusão frequentemente se renatura com facilidade devido a presença de moléculas chaperonas (KOPITO, 2000).

No caso de toxinas, a vantagem de produzir produtos recombinantes insolúveis é que esses agregados são considerados toxóides e podem ser manipulados com mais facilidade e utilizados para imunização sem os efeitos tóxicos (SILVEIRA DE OLIVEIRA et al., 2000). Além disso, muitas vezes esses agregados insolúveis são mais imunogênicos produzindo soros policlonais com alto título,

Antigamente considerava-se o corpúsculo de inclusão como um produto descartável, pois acreditava-se que as proteínas formadas no interior do corpúsculo de inclusão não estavam enoveladas da forma correta e por consequência não possuíam atividades biológicas (PETERNEL et al., 2008). Hoje sabe-se que as proteínas recombinantes produzidas na forma de corpúsculo de inclusão não são necessariamente inativas, os corpúsculos de inclusão podem ser formados por polipeptídeos biologicamente ativos (GARCIA-FRUITOS et al., 2010).

Para se obter corpúsculo de inclusão contendo proteínas funcionais é necessário um profundo conhecimento da estrutura e formação do corpúsculo de inclusão, afim de identificar possíveis alvos moleculares que possam ser afinados

para melhorar o rendimento de recuperação das proteínas ou para obter o corpúsculo de inclusão com as características desejadas (RAMÓN et al., 2014).

Mesmo que as proteínas sejam produzidas na forma de corpúsculos de inclusão, muitas vezes seu processo de renaturação não é único pois, hoje em dia existem diversos métodos de renaturação físico-químicos, como por exemplo, a utilização de câmaras de alta pressão (BALDUINO et al., 2011; CHURA-CHAMBI et al., 2008; LEMKE et al., 2015; RODRIGUES et al., 2014).

Para proteínas que não podem ser expressas no espaço citoplasmático devido ao ambiente redutor, o espaço periplasmático seria uma boa opção. O espaço periplasmático oferece algumas vantagens para a produção de proteínas recombinantes, por exemplo, aquelas proteínas secretadas que possuem pontes dissulfeto (SWARTS, 2001). Proteínas com pontes dissulfeto devem ser expressas no periplasma devido ao seu ambiente oxidativo (TERPE et al., 2006). No periplasma há uma facilidade em expressar a proteína em sua conformação nativa e a purificação é facilitada (DEMAIN; VAISHNAV, 2009; MAKRIDES, 1996).

A expressão da proteína recombinante precisa ser direcionada por um sinal de secreção periplasmática procariótico eficiente e que permita a correta clivagem da proteína recombinante madura (CHOI; LEE, 2004). Por outro lado a cadeia respiratória da bactéria é dependente da membrana interna e do espaço periplasmático, a sobrecarga na translocação da proteína recombinante pode levar a formação de agregados e inclusive romper a cadeia respiratória celular causando efeitos tóxicos ao hospedeiro bacteriano (informação pessoal PRIETO DA SILVA).

Para os polipeptídeos serem secretados para o periplasma é necessário uma sequência sinal líder na região N-terminal, que indicará o destino dessa proteína. Esse peptídeo sinal é clivado durante o processo de translocação da proteína para o periplasma (BANEYX, 1999). O peptídeo sinal possui entre 18-30 aminoácidos, resíduos básicos na região N-terminal, um núcleo central hidrofóbico e uma região C-terminal hidrofílica (BANEYX, 1999). O precursor da crotamina, que é uma proteína secretada, também apresenta um peptídeo sinal, mas devemos lembrar que os peptídeos sinais eucarióticos são diferentes dos peptídeos sinais procarióticos. Poucos peptídeos sinais de eucariotos funcionam bem em sistemas de expressão bacterianos. Assim sendo, para direcionar a expressão de proteínas

recombinantes no periplasma se faz necessário utilizar sequências líder de proteínas bacterianas secretadas como, por exemplo, o peptídeo sinal OmpA (*Outer Membrane Protein A*). Algumas proteínas heterólogas complexas foram expressas com sucesso no periplasma como a enzima ativadora de plasminogênio tecidual – tPA (QIU et al., 1998), inibidor de tripsina pancreática bovina (OSTARMEIER; GEORGIUS, 1994), entre outras.

Sendo assim, a crotamina foi escolhida para fazer a construção de genes sintéticos e posterior expressão de seu produto recombinante em citoplasma e periplasma de *Escherichia coli*, já que essa proteína é de difícil obtenção *in natura*. Além disso, a quantidade de veneno extraída é pequena e o veneno é necessário para outros fins de saúde pública, como a fabricação do soro utilizado no tratamento do envenenamento por crotalídeos. Além do mais a crotamina só está presente em serpentes crotamina positiva na proporção de 5% do veneno bruto. Também seria necessário purificar a crotamina sendo que muitas vezes sobram outras toxinas com atividade contaminante. Outra possibilidade de produção de crotamina seria obtê-la por síntese química, entretanto esse processo é bastante caro e o fato da toxina conter pontes dissulfeto acaba dificultando o processo de síntese da proteína. A produção de proteínas recombinantes permite obter grandes quantidades de proteína pura de forma homogênea, estudar sua renaturação, modificar e substituir aminoácidos alterando a função tóxica e permitir estudos de caracterização.

3 OBJETIVO

Expressar Crotamina recombinante, uma miotoxina de serpente composta por 42 aminoácidos e estabilizada por três pontes dissulfeto, em *Escherichia coli*.

3.1 Objetivos Específicos

- Expressar crotamina recombinante no citoplasma sob o controle de um promotor de T7.
- Expressar a Crotamina no espaço periplasmático, fusionada ao peptídeo sinal de OmpA

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para realizar o projeto foi necessário construir três cassetes de expressão para produção de crotamina recombinante em *Escherichia coli*.

4.1 Estratégia de Clonagem

Foram planejados dois genes sintéticos para expressão de crotamina recombinante em periplasma e um gene sintético para expressão de crotamina recombinante em citoplasma. Para o desenho dos cassetes de expressão foi utilizado o programa pDRAW32 DNA Analysis (ACACLONE; pDRAW32, 2013), que permite desenhar estratégias de clonagem para posterior expressão. Para realizar as construções para expressão em periplasma foi utilizada a sequência do peptídeo sinal bacteriano OmpA e a sequência da crotamina madura. Para realizar a construção para expressão em citoplasma foi utilizada somente a sequência da crotamina madura. A sequência do peptídeo sinal de OmpA e a sequência da crotamina madura foram obtidas a partir das sequências do banco de dados Uniprot (www.uniprot.org acessado em 08/08/2013). A produção dos genes sintéticos foi feita pela empresa GeneArt Gene Synthesis.

Os três genes sintéticos construídos para a expressão da crotamina recombinante em *Escherichia coli* foram clonados no vetor pRSET-A (Figura 10) da empresa Invitrogen®. Proteínas clonadas nesse tipo de vetor alcançam altos níveis de expressão devido à presença do promotor T7. Além do promotor T7, outro elemento importante encontrado neste vetor é o sítio RBS (*Ribosome Binding Site*) que indica o start códon da transcrição. Na região N-terminal do vetor há a presença de uma cauda de fusão, esta cauda é composta por uma tag de histidina (6 x HIS) que facilita a purificação da proteína recombinante em um único passo por cromatografia de afinidade em uma coluna quelante carregada com Ni^{2+} . Um sítio de reconhecimento de clivagem de enteroquinase, que separa a cauda de fusão da proteína de interesse e o sítio múltiplo de clonagem (*MCS – Multiple Cloning Site*), região na qual o gene de interesse é inserido. A marca de resistência do vetor é dada pelo gene *bla_{amp}* que produz β -lactamase conferindo ao hospedeiro resistência à ampicilina.

Figura 10 – Vetor comercial pRSET-A Invitrogen®. Em rosa claro destaca-se a região do promotor T7, a caixa indica o sítio de ancoramentoda RNA polimerase II de *E. coli*ao promotor de T7. A cor rosa escuro é a proteína de fusão e nela contém o RBS (*Ribosome Binding Site*), o start códon do N-terminal do capsídeo do gene 10 do fago T7 incluindo o sítio de ligação metálica (6 x HIS) e o sítio de clivagem por enteroquinase (EK).

Para realizar as construções dos cassetes de expressão, foram utilizadas somente a parte codificante da crotamina madura. Por se tratar de uma proteína de eucarioto sendo expressa em procarioto, a sequência da crotamina madura teve os seus códons raros otimizados de acordo com os códons preferenciais de *E. coli* (Tabela 2).

CODON USAGE IN *E. COLI* GENES¹

	Codon	Amino acid ²	% ³	Ratio ⁴	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	
U	UUU	Phe (F)	1.9	0.51	UCU	Ser (S)	1.1	0.19	UAU	Tyr (Y)	1.6	0.53	UGU	Cys (C)	0.4	0.43	U
	UUC	Phe (F)	1.8	0.49	UCC	Ser (S)	1.0	0.17	UAC	Tyr (Y)	1.4	0.47	UGC	Cys (C)	0.6	0.57	
	UUA	Leu (L)	1.0	0.11	UCA	Ser (S)	0.7	0.12	UAA	STOP	0.2	0.62	UGA	STOP	0.1	0.30	
	UUG	Leu (L)	1.1	0.11	UCG	Ser (S)	0.8	0.13	UAG	STOP	0.03	0.09	UGG	Trp (W)	1.4	1.00	
C	CUU	Leu (L)	1.0	0.10	CCU	Pro (P)	0.7	0.16	CAU	His (H)	1.2	0.52	CGU	Arg (R)	2.4	0.42	U
	CUC	Leu (L)	0.9	0.10	CCC	Pro (P)	0.4	0.10	CAC	His (H)	1.1	0.48	CGC	Arg (R)	2.2	0.37	
	CUA	Leu (L)	0.3	0.03	CCA	Pro (P)	0.8	0.20	CAA	Gln (Q)	1.3	0.31	CGA	Arg (R)	0.3	0.05	
	CUG	Leu (L)	5.2	0.55	CCG	Pro (P)	2.4	0.55	CAG	Gln (Q)	2.9	0.69	CGG	Arg (R)	0.5	0.08	
A	AUU	Ile (I)	2.7	0.47	ACU	Thr (T)	1.2	0.21	AAU	Asn (N)	1.6	0.39	AGU	Ser (S)	0.7	0.13	U
	AUC	Ile (I)	2.7	0.46	ACC	Thr (T)	2.4	0.43	AAC	Asn (N)	2.6	0.61	AGC	Ser (S)	1.5	0.27	
	AUA	Ile (I)	0.4	0.07	ACA	Thr (T)	0.1	0.30	AAA	Lys (K)	3.8	0.76	AGA	Arg (R)	0.2	0.04	
	AUG	Met (M)	2.6	1.00	ACG	Thr (T)	1.3	0.23	AAG	Lys (K)	1.2	0.24	AGG	Arg (R)	0.2	0.03	
G	GUU	Val (V)	2.0	0.29	GCU	Ala (A)	1.8	0.19	GAU	Asp (D)	3.3	0.59	GGU	Gly (G)	2.8	0.38	U
	GUC	Val (V)	1.4	0.20	GCC	Ala (A)	2.3	0.25	GAC	Asp (D)	2.3	0.41	GGC	Gly (G)	3.0	0.40	
	GUA	Val (V)	1.2	0.17	GCA	Ala (A)	2.1	0.22	GAA	Glu (E)	4.4	0.70	GGA	Gly (G)	0.7	0.09	
	GUG	Val (V)	2.4	0.34	GCG	Ala (A)	3.2	0.34	GAG	Glu (E)	1.9	0.30	GGG	Gly (G)	0.9	0.13	
	U				C				A				G				

Tabela 2 – Códons preferenciais de *Escherichia coli*. Destacado em vermelho as trincas de bases menos usadas ou com menos presença de transportadores estão destacadas em vermelho

4.1.1 Construção do cassete de expressão para produção de crotamina no Periplasma

Para a construção dos dois cassetes de expressão para a produção de crotamina recombinante no espaço periplasmático foi utilizada a sequência do peptídeo sinal bacteriano de OmpA (*Outer Membrane Protein*) e a sequência da crotamina madura.

Já que a proteína a ser expressa no periplasma é uma toxina presente na glândula de veneno da serpente, a toxina possui um peptídeo sinal indicando que essa proteína deve ir para o lúmen da glândula. Entretanto, poucos peptídeos sinais

de eucariotos são sinais de secreção eficientes em sistemas procarióticos, sendo aconselhada a troca da sequência líder por um peptídeo sinal procariótico. Dessa maneira, para a construção do gene sintético, o peptídeo sinal da crotamina foi substituído pela sequência líder de OmpA. Esse peptídeo sinal de OmpA indica que a proteína deve ser expressa no periplasma bacteriano.

No mRNA da crotamina há a presença de um códon de Lisina (K) C-terminal, esse aminoácido é clivado durante o processo de maturação da proteína, ou seja, foi necessário retirar sua sequência para a construção do gene sintético. Então, somente a porção que corresponde à crotamina madura foi utilizada para a construção do cassete de expressão, como pode ser visto na figura 12.

Foram feitas duas construções com a crotamina madura para expressão no periplasma. Em uma construção utilizou-se a sequência líder de OmpA em seu estado nativo sendo que apenas a região codificante da crotamina madura teve seus códons preferenciais otimizados. Esse vetor recebeu o nome pRSET-A OmpA Cro. Já na outra construção, a mesma sequência líder de OmpA foi utilizada porém essa sequência líder foi otimizada assim como a crotamina madura. Esse vetor recebeu o nome de pRSET-A Opt OmpA Cro.

Nos dois cassetes de expressão foram adicionados sítios de restrição para a correta inserção do cassete no vetor pRSET-A, de modo que seja respeitada a fase de leitura. Na região N-terminal de OmpA foi adicionada a sequência de restrição *NdeI* que corresponde ao códon iniciador Metionina (ATG) do peptídeo sinal de OmpA, em seguida foi colocada a sequência da crotamina madura com seus códons devidamente otimizados e na região C-terminal da crotamina foram colocados dois códons de terminação (TAA) e o sítio de *XhoI*. É importante lembrar que na sequência do mRNA da crotamina há a presença de uma lisina (K) C-terminal que é excisada no processo de maturação da toxina, ou seja, essa lisina (K) não existe na proteína madura. Em nossa construção a lisina C-terminal foi trocada por um códon de terminação, por isso a presença de dois *stop* códons na região C-terminal.

Figura 11 – Substituição do peptídeo sinal da crotamina pelo peptídeo sinal de OmpA. A cor amarela representa o peptídeo sinal da crotamina, a cor laranja indica a sequência madura da toxina, a cor amarelo-escuro representa o peptídeo sinal de OmpA. A figura também mostra onde foram colocados os sítios de restrição *Nde*I e *Xho*I, as hachuras em branco indicam onde foram feitas as otimizações.

Alguns códons no peptídeo sinal de OmpA também foram trocados, pois apesar desse peptídeo sinal ser proveniente da bactéria *E. coli*, também apresenta alguns códons raros, como pode ser observado na figura 13

Há relatos na literatura de que a maioria dos peptídeos sinais de procariotos contém códons raros que atrasam a expressão e a passagem da proteína nascente para o periplasma bacteriano. A otimização desses códons na sequência do peptídeo sinal pode influir aumentando ou diminuindo a expressão (ZALUCKI et al., 2007). Por essa razão, foram feitas duas construções, com e sem a sequência líder da OmpA otimizada, para verificarmos se a presença ou não de códons raros no peptídeo sinal poderia influir na expressão periplasmática da crotamina recombinante.

Da forma que os insertos foram construídos neste trabalho, eles substituem completamente o cassete de expressão do plasmídeo comercial, incluindo o *start* códon, as caudas de fusão e o sinal de terminação original.

SP OmpA	1	---	ATG	AAA	AAG	ACA	GCT	ATC	GCG	ATT	GCA	GTG	GCA	CTG	GCT	GGT	TTC	48
CRO	1	---	ATG	AAA	AAA	ACC	GCA	ATT	GCC	ATT	GCA	GTT	GCA	CTG	GCA	GGT	TTT	48
Opt_OmpA_CRO	1	CAT	ATG	AAA	AAA	ACC	GCA	ATT	GCC	ATT	GCA	GTT	GCA	CTG	GCA	GGT	TTT	48
OmpA_CRO	1	CAT	ATG	AAA	AAG	ACA	GCT	ATC	GCG	ATT	GCA	GTG	GCA	CTG	GCT	GGT	TTC	48
AA	1		M	K	K	T	A	I	A	I	A	V	A	L	A	G	F	15
SP OmpA	49	GCT	ACC	GTA	GCG	CAG	GCC	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	96
CRO	49	---	---	---	---	---	---	TAT	AAA	CAG	TGT	CAT	AAG	AAA	GGA	GGA	CAC	96
Opt_OmpA_CRO	49	GCA	ACC	GTT	GCA	CAG	GCA	TAT	AAA	CAG	TGC	CAT	AAA	AAA	GGT	GGT	CAC	96
OmpA_CRO	49	GCT	ACC	GTA	GCG	CAG	GCC	TAT	AAA	CAG	TGT	CAT	AAA	AAA	GGT	GGT	CAC	96
AA	16		A	T	V	A	Q	A	Y	K	Q	C	H	K	K	G	H	30
SP OmpA	97	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	144
CRO	97	TGC	TTT	CCC	AAG	GAG	AAA	ATA	TGT	CTT	CCT	CCA	TCT	TCT	GAC	TTT	GGG	144
Opt_OmpA_CRO	97	TGC	TTT	CCG	AAA	GAA	AAA	ATC	TGT	CTG	CCT	CCG	AGC	AGC	GAT	TTT	GGT	144
OmpA_CRO	97	TGC	TTC	CCG	AAA	GAA	AAA	ATC	TGT	CTG	CCT	CCG	AGC	AGC	GAT	TTT	GGT	144
AA	31		C	F	P	K	E	K	I	C	L	P	P	S	S	D	F	45
SP OmpA	145	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	192
CRO	145	AAG	ATG	GAC	TGT	CGA	TGG	AGA	TGG	AAA	TGC	TGT	AAA	AAG	GGA	AGT	GGA	192
Opt_OmpA_CRO	145	AAA	ATG	GAT	TGT	CGT	TGG	CGT	TGG	AAA	TGT	TGC	AAA	AAA	GGT	AGC	GGT	192
OmpA_CRO	145	AAA	ATG	GAT	TGT	CGT	TGG	CGT	TGG	AAA	TGT	TGC	AAA	AAA	GGT	AGC	GGT	192
AA	46		K	M	D	C	R	W	R	W	K	C	C	K	K	G	S	60
SP OmpA	193	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	204
CRO	193	AAA	TAA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	204
AA	61		K	*														204
Opt_OmpA_CRO	193	TAA	TAA	CTC	GAG													204
OmpA_CRO	193	TAA	TAA	CTC	GAG													204
			*	*														
			stop codons															

Figura 12 - Codons otimizados nas construções para expressão de crotamina no periplasma. **SP OmpA** corresponde ao peptídeo sinal natural bacteriano e **CRO** indica a sequência codificante para a crotamina madura natural. Essas sequências foram alinhadas com os cassetes de expressão e as posições mutadas na substituição de códons raros estão indicadas em branco. A proteína resultante está indicada na linha indicada (AA) sendo que a caixa cinza clara indica o peptídeo sinal de OmpA enquanto que a caixa cinza mais escura indica a crotamina madura. **Opt OmpA Cro** corresponde à otimização completa de todos os códons raros tanto do peptídeo sinal (OmpA) como da crotamina madura. Esse inserto sintético foi clonado no vetor pRSET-A resultando no vetor pRSET-A Opt OmpA Cro. **OmpA Cro** corresponde ao gene sintético em que apenas a sequência codificante para a crotamina madura teve os códons raros otimizados, a sequência líder de OmpA não foi alterada. Esse inserto sintético foi clonado em pRSET-A resultando no vetor pRSET-A OmpA Cro. A lisina C-terminal foi retirada a partir da posição 192 e foi substituída por um stop códon (*).

4.1.2 Construção do cassete de expressão para produção de crotamina no Citoplasma

Para a construção do vetor de expressão para produção de crotamina recombinante no citoplasma, somente a região codificante da toxina madura teve seus códons otimizados de acordo com os códons preferenciais de *E. coli* (Tabela 1), resultando em uma sequência que codifica a crotamina madura com os mesmos códons alterados de forma idêntica ao cassete OmpA_CRO da figura 13.

Como visto na figura 10, o vetor comercial pRSET-A contém um sítio múltiplo de clonagem com diversas enzimas de restrição, que permite clonar a sequência da proteína de interesse em fusão com a região N-terminal do vetor comercial. Entretanto, a fusão presente no vetor não é interessante, pois acrescentaria 5 aminoácidos na região N-terminal da crotamina após a clivagem por enteroquinase. Dessa maneira, a forma como o vetor para expressão em citoplasma foi construído substitui toda a cauda de fusão da região N-terminal do vetor comercial pelo cassete sintético.

Para a crotamina recombinante ser expressa no citoplasma, o cassete de expressão foi montado da seguinte maneira: na região 5'-terminal da crotamina foi colocada uma cauda de fusão composta pelo sítio de restrição *Nde*I, 6 x Histidina (6 x HIS) e o sítio de reconhecimento de clivagem para enteroquinase. Na região 3'-terminal da crotamina a lisina terminal foi substituída por um códon de terminação originado dois sinais TAA e acrescentado um sítio de restrição *Xho*I. Esse vetor recebeu o nome de pRSET-A Cro (Figura 14).

O cassete de expressão construído foi colocado *em* fase de leitura com o início da transcrição do gene em relação ao RBS. Dessa forma, toda a cauda de fusão do plasmídeo comercial foi substituída pelo novo cassete de expressão.

Figura 13 – Construção do cassete de expressão para o citoplasma. Este cassete vai ser clonado em vetor pRSET-A resultando o vetor pRSET-A Cro. A cor amarela representa o peptídeo sinal da serpente. A cor laranja mostra a região da toxina madura. Em laranja-claro está a cauda de fusão (6xHIS e EK) e as hachuras em branco representam os códons raros otimizados.

4.2 Preparo de Bactérias competentes TOP10 pelo método de Cloreto de Cálcio (CaCl₂)

Uma colônia da bactéria TOP10 foi crescida em meio Luria-Bertani (LB) (10 g de tripton, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, 1 mL de 1N NaOH para fazer 1 L de meio de cultura) e incubada *overnight* (16 h a 18 h) sob agitação (Tecnal TE

422) a 250 rpm a 37 °C. Após o período de incubação, em um frasco contendo 50 mL de meio de cultura LB foram adicionados 250 µL do pré-inóculo. Essa cultura foi colocada novamente a 37 °C sob agitação a 250 rpm por tempo necessário até o crescimento bacteriano chegar a densidade óptica (DO_{600}) de 0,375. Ao atingir a DO_{600} necessária, o frasco foi colocado em banho de gelo por 10 minutos. Foram feitas alíquotas de aproximadamente 1,5 mL e então foi feito o processo de centrifugação (Tomy MRX - 152) a 1600 x g por 7 minutos a 4 °C.

Terminado o processo de centrifugação os sobrenadantes foram descartados e as células foram ressuspensas gentilmente em 1,25 mL de solução de $CaCl_2$ (60 mM de $CaCl_2$; 15% de Glicerol; 10 mM de PIPES pH 7) gelada. Os tubos foram centrifugados a 1100 x g por 5 minutos a 4 °C e os sobrenadantes foram descartados. As células foram novamente ressuspensas em 1,25 mL de solução de $CaCl_2$ gelada e os tubos foram colocados em banho de gelo por 30 minutos. Após o repouso em gelo os tubos foram centrifugados a 1100 x g por 5 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e as bactérias foram ressuspensas em 250 µL de solução de $CaCl_2$ gelada. Aliquotas de 50 µL foram congeladas imediatamente a -80 °C.

4.3 Transformação dos plasmídeos em bactéria TOP10 e plaqueamento

Os plasmídeos pRSET-A Cro; pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro foram transformadas em bactérias cálcio competentes da linhagem TOP10. O procedimento iniciou-se com o descongelamento de 50 µL da bactéria competente TOP10 por 15 minutos em gelo. Após este período, ainda em gelo, foram adicionado aproximadamente 100 ng dos plasmídeos citados. Os vetores ficaram incubados com as bactérias por 30 minutos.

As bactérias foram submetidas a choque térmico através da incubação por 45 segundos a 42 °C, em seguida retornaram ao banho de gelo por 10 minutos. Após este procedimento 900 µL de meio SOC (0,5% de extrato de levedura; 2% de triptona; 10 mM de NaCl; 2,5 mM de KCl; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM de $MgSO_4$; 20 mM de Glicose) foram adicionados às bactérias que permaneceram sob agitação a 150 rpm por 1 hora e 30 minutos.

Após o crescimento, a cultura foi plaqueada em meio LB/ágar contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubados em estufa (Quimis) a 37 °C por 16h – 18h.

4.4 Extração dos plasmídeos pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro da bactéria TOP10

Os plasmídeos foram extraídos das bactérias hospedeiras por lise alcalina. Para este procedimento foi utilizado o GeneJet Plasmid MiniPrep kit (Fermentas[®]).

Colônias de bactérias TOP10 transformadas com os plasmídeos pRSET-A (controle), pRSET-A Cro; pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro, foram isoladas e inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 5 µL de ampicilina (100 µg/mL). As amostras foram incubadas por 16h a 18h a 37 °C sob agitação de 250 rpm. No dia seguinte, a cultura bacteriana foi transferida para tubos de polipropileno de 1,5 mL e os tubos foram centrifugados a 8000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e às células bacterianas foram adicionados 250 µL de solução de ressuspensão. O precipitado foi homogeneizado vigorosamente em vortex V-1 plus Biosan para ressuspensão total do precipitado celular. Foram acrescentados 250 µL da solução de lise seguido de homogeneização cuidadosa por inversão dos tubos de 4 – 6 vezes. A homogeneização foi realizada até a solução ficar viscosa e ligeiramente clara. Em seguida, foram adicionados 350 µL da solução de neutralização e novamente foi feita homogeneização cuidadosa por inversão dos tubos de 4 – 6 vezes. Os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 5 minutos.

Para purificar o DNA de interesse, o sobrenadante foi colocado em microcoluna de sílica acoplada a um tubo de microcentrífuga do Kit, e o material foi centrifugado a 12000 x g por 1 minuto. O material não retido na coluna foi descartado.

Foram adicionados 500 µL da solução de lavagem ao DNA retido na coluna e os tubos foram novamente centrifugados por 1 minuto a 12000 x g. O material não retido na coluna foi descartado e o procedimento foi repetido. Foi feita uma nova centrifugação a 12000 x g por 1 minuto para remover qualquer resíduo da solução de lavagem.

Para a eluição dos plasmídeos da coluna, primeiro foi preciso transferir a coluna para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL estéril e identificado, e foram adicionados 50 µL do tampão de eluição TE (10 mM de Tris-HCl, pH 8; 1 mM de EDTA). Os tubos ficaram incubando por 2 minutos a temperatura ambiente e então foram centrifugados por 2 minutos a 12000 x g. Em seguida, os tubos contendo o DNA eluído foram armazenados a -20 °C.

4.5 Eletroforese em gel de Agarose 1,2%

Para cada amostra obtida na miniprep foram utilizados 2 µL de 6 x LoadingDye da marca Invitrogen®. Foram adicionadas 100 ng de cada plasmídeo e a água foi adicionada conforme necessário. O volume final de cada reação foi de 12 µL. As amostras foram carregadas em gel de agarose 1,2% (1,2 g de agarose; 100 mL de solução TAE) e a corrida foi feita em tampão de eletroforese TAE 1 x (TAE 50 x: 242 g de Tris base pH 8; 57,1 mL de ácido acético glacial; 0,5 M de EDTA).

Neste procedimento, o gel foi submetido à corrente de 80 Volts por 50 minutos. Após a corrida, o gel foi colocado em uma solução de brometo de etídio (EtBr) (0,1 mg/mL) por 10 minutos. Em seguida o gel foi colocado para descorar em água por mais 10 minutos. O DNA corado pelo brometo de etídio pode ser visualizado de forma luminescente alaranjada através da incidência de luz ultravioleta (UV).

4.6 Dupla Digestão Enzimática dos plasmídeos pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro

Os plasmídeos pRSET-A (controle), pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro, pRSET-A Opt OmpA Cro foram submetidos ao protocolo de dupla digestão enzimática utilizando *XbaI* em combinação com *BamHI* ou *HindIII* da Fermentas®.

Em um tubo de polipropileno foi adicionado 1 µL de 10 x FastDigest Buffer, 1 µL da enzima de restrição *XbaI*, 1 µL da enzima de restrição *BamHI*, 2 µL de H₂O MilliQ e 5 µL de plasmídeo. Logo em seguida os tubos foram colocados em banho seco (Kasvi) a 37 °C por 15 minutos. Em seguida os tubos foram armazenados a -20 °C. O mesmo procedimento foi realizado utilizando as enzimas de restrição *XbaI* e *HindIII*. Seguindo o protocolo citado acima.

4.7 Expressão de pRSET-A Cro x BL21(DE3)

Colônias de *Escherichia coli* BL21(DE3) transformadas com o vetor pRSET-A Cro foram selecionadas da placa e inoculadas em 5 mL de meio Terrific Broth - TB (12 g de Triptona; 24 g de Extrato de levedura; 4 mL de Glicerol; 0,17 M de KH_2PO_4 ; 0,72 M K_2HPO_4) contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. As culturas foram crescidas entre 16h – 18h sob agitação de 250 rpm a 37 °C e, no dia seguinte, os pré inoculos foram diluídos para uma DO_{600} 0,1 em 30 mL de meio Terrific Broth contendo ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$). O crescimento foi monitorado por leitura em espectrofotômetro (Bio Photometer plus - Eppendorf) até atingir $\text{DO}_{600} = 0,6$.

Após atingir a DO_{600} desejada, a cultura foi dividida em dois *erlenmeyers*, A (sem indução) e B (com indução). A indução (*erlenmeyer* B) da transcrição do fragmento do gene inserido no plasmídeo foi feita pela adição de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactósido) em uma concentração final de 0,4 mM.

A cada hora foram coletadas alíquotas de cada cultura. Uma alíquota foi retirada para a leitura da DO_{600} para comparar a densidade óptica entre o não induzido (A) e o induzido (B). A segunda alíquota foi utilizada para centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos a 4 °C. A indução prosseguiu durante quatro horas.

Cada alíquota retirada para centrifugação teve seu sobrenadante descartado e o seu precipitado bacteriano foi ressuspenso em solução de TE (10 mM de Tris-HCl, pH 8; 1mM de EDTA pH 8). As células obtidas foram mantidas a -20 °C até serem submetidas ao processo de lise.

A lise das células ocorreu por choque térmico. Os tubos de polipropileno foram colocados em banho seco a 42 °C por 3 minutos, após este período foram imediatamente colocados a -80 °C durante 5 minutos. Esse processo foi repetido por cinco vezes. Após a lise celular foi feita uma centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo devidamente identificado e foi adicionado tampão de amostra 2 x SDS (7 mL Tris-Cl/SDS, pH 6.8; 3 mL Glicerol; 1 g SDS; 0,93 g Ditiotretol; 1,2 mg Azul de Bromofenol). O precipitado foi ressuspenso no mesmo tampão de amostra com redução 2 x SDS. As amostras foram armazenadas a -20 °C para posterior análise em gel de SDS-PAGE.

4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE

Utilizando o sistema de eletroforese MiniProtean (BioRad), as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%. Primeiramente foi preparado o gel de corrida a 15% e em seguida foi preparado o gel de empilhamento a 5%. As amostras preparadas com tampão de aplicação com redução 6 x SDS foram fervidas a 95 °C em banho seco por 15 minutos e carregadas no gel de poliacrilamida. Como padrão de massa molecular utilizou-se o *SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard* e o controle positivo utilizado foi a crotamina purificada (Gentilmente cedida pelo Professor Branchi – USP Ribeirão Preto)

A corrida eletroforética foi realizada utilizando o tampão de eletroforese (15,1 g de Tris base; 72 g de Glicina; 5 g de SDS) com uma voltagem de 80 V a temperatura ambiente durante 2 horas. Após a migração das proteínas, o gel foi corado por Comassie Brilliant Blue R250 (0,05% de Comassie Blue R250 em solução fixadora - 50% de Metanol; 10% de Ácido Acético; 40% de Água).

4.9 Western Blotting

Utilizou-se a técnica de Western Blotting vertical para fazer a eletrotransferência das proteínas do gel de SDS-PAGE para uma membrana de nitrocelulose (0,45 µm Nitrocellulose Blotting Membrane - GE). Para tanto, foi utilizado o equipamento MiniProtean (BioRad). A reação se deu em tampão de transferência (6 g Tris base; 28,8 g Glicina; 400 mL Metanol; completar com H₂O para 2 L) por aproximadamente 1 hora com uma corrente elétrica no sentido horizontal de 400 mA.

Após a transferência, a membrana foi submetida à solução de bloqueio 5% (5 g de leite Molico solubilizado em tTBS - 100 mM Tris-Cl pH 7.5; 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) por 1 hora. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo primário de coelho anti-crotamina (produzido no Instituto Butantan gentilmente cedido pela Dra. Nancy Oguiura – Laboratório de Ecologia e Evolução – Instituto Butantan) na diluição de 1:4000 por 16h – 18h.

A membrana foi lavada 3 vezes durante 20 minutos com tTBS e incubada com o anticorpo secundário anti-coelho HRP (Santa Cruz) 1:500 por 1 hora. O processo de lavagem foi repetido por 3 vezes durante 20 minutos com tTBS. Após as lavagens a membrana foi incubada com solução reveladora conjugada com fosfatase alcalina e revelada em sala escura.

4.10 Redução da reatividade cruzada do anticorpo

O anticorpo policlonal anti-crotamina feito no Instituto Butantan foi produzido em coelho, no intestino do coelho há a presença de *E. coli* o que pode causar reatividade cruzada contra proteínas da bactéria utilizada como vetor, por isso foi necessário fazer a redução da reatividade cruzada do anticorpo seguindo o protocolo descrito por Gruber e Zingales (1995).

Primeiramente, foi crescida uma colônia de bactéria BL21(DE3) em 20 mL de meio LB *overnight* a 37 °C em 250 rpm. No dia seguinte foi acrescentado 1 mM de IPTG e a cultura foi crescida por mais 2 horas. Após as 2 horas a cultura foi dividida em duas alíquotas de 10 mL e os frascos foram identificados como A e B. O frasco A foi colocado em autoclave a 121 °C por 1 hora, ao terminar o processo o frasco A com o aglutinado bacteriano foi deixado resfriando em temperatura ambiente. Ao frasco B foi adicionado 0,5% de formaldeído de forma a preservar a estrutura da parede celular. O frasco B foi colocado sob agitação a 250 rpm por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, os dois aglutinados bacterianos mortos (frascos A e B) foram misturados e bem homogeneizados. O aglutinado bacteriano foi centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano foi lavado 2 vezes com 20 mL de PBS. Foi realizada uma nova centrifugação e o sobrenadante foi novamente descartado. O precipitado bacteriano foi ressuspensionado em 20 mL de PBS e aliquoteado em grupos de 8 tubos, cada tubo com 1 mL. A suspensão foi centrifugada a 5000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Os precipitados celulares foram armazenados a -20 °C até o momento de uso.

O anticorpo anti-crotamina foi diluído para uma concentração de 1:20 em PBS + 1% BSA. Os precipitados da suspensão bacteriana armazenados a -20 °C foram descongelados em gelo por 15 minutos. O precipitado bacteriano do tubo 1 foi

ressuspendido no volume de anticorpo diluído em PBS + 1% BSA. O anticorpo ficou incubando com a suspensão bacteriana por 2 horas sob agitação suave a 4 °C. Após as 2 horas foi realizada uma centrifugação a 5000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para o tubo 2 e o precipitado foi descartado. As incubações do soro com os precipitados da suspensão bacteriana foram repetidas seriadamente quatro vezes.

4.11 Dot Blot

O objetivo do experimento é detectar quantidades de antígeno (crotamina) por uma diluição pré-fixada de 1:4000 de anticorpo primário de coelho anti-crotamina. Detectar qual a quantidade mínima de anticorpo secundário anti-coelho conjugado na diluição recomendada pelo fabricante (1:2000) pelo anticorpo primário. E detectar reatividade cruzadas dos anticorpos pelo extrato bacteriano.

Para realizar este experimento foi preciso cortar 8 tiras de 1 cm de largura de membrana de nitrocelulose e dividi-las com marcação a lápis em seis campos de 0,5 cm. Uma tira recebeu o nome AB (anticorpo primário de coelho anti-crotamina) e as demais tiras receberam o nome de EC (Extrato bacteriano de *E. coli*) e AG (Antígeno – crotamina purificada). A tira AB recebeu 1 µL de cinco diluições seriadas do anticorpo primário (1:1000; 1:2000; 1:4000; 1:6000 e 1:8000). A tira EC recebeu 1 µL de quatro diluições seriadas de extrato bacteriano (1:1; 1:10; 1:100 e 1:1000). Essas duas tiras foram utilizadas como controle e só receberam anticorpo secundário anti-coelho HRP da empresa GE em uma concentração 1:1000.

As tiras experimentais foram marcadas como AG e EC. As tiras marcadas com EC receberam 1 µL de quatro diluições seriadas de extrato bacteriano. As tiras AG receberam 1 µL de cinco diluições seriadas de crotamina purificada (1 µg; 0,1µg; 10 ng; 1 nge 0,1 ng). As tiras de nitrocelulose foram divididas em 3 grupos: um grupo EC/AG para aplicação do anticorpo primário 1:2000; um segundo grupo EC/AG para a aplicação do anticorpo primário 1:4000 e um terceiro grupo EC/AG para a aplicação do anticorpo primário 1:8000. Para esse conjunto de tiras foi aplicado o anticorpo secundário anti-coelho HRP GE em uma concentração 1:1000. Como mostra a figura 15 abaixo.

Figura 14 – Ensaio de Dot Blot. Grupo controle AB (diluições seriadas 1:1000 a 1:8000); EC (diluições seriadas de 1:10 a 1:1000). No grupo controle só foi aplicado anticorpo secundário anti-coelho HRP 1:1000. Tiras EC (diluições seriadas de 1:10 a 1:1000); AG (diluições seriadas 1 µg a 0,1 ng) nas demais tiras foram aplicadas diferentes concentrações do anticorpo primário anti-crotamina (1:2000; 1:4000; 1:8000) e a concentração do anticorpo secundário foi 1:1000.

As tiras foram bloqueadas com solução de bloqueio 5% durante 1 hora. Em seguida foi colocado o anticorpo primário em suas respectivas concentrações. O anticorpo primário anti-crotamina ficou agindo com as tiras de nitrocelulose *por* 16h – 18h. No dia seguinte, foram feitas as lavagens de acordo com o protocolo de Western Blotting. Após as 3 lavagens foi colocado o anticorpo secundário anti-coelho HRP na concentração de 1:1000. Todas as tiras receberam o anticorpo secundário, inclusive o grupo controle.

Este protocolo foi também realizado utilizando diferentes concentrações do anticorpo secundário, 1: 2000 e 1: 40000.

4.12 Preparo de bactéria competente pelo método 1x TSS

As bactérias BL21-AI foram preparadas de acordo com o protocolo 1 x TSS (*Transformation Storage Solution*: 20% de PEG; 100 mM de MgCl₂; 10% de DMSO pH 6,5). Uma colônia de BL21-AI foi crescida *overnight* a 37 °C sob agitação de 250 rpm. A cultura foi diluída para uma DO₆₀₀ de 0,1 em meio LB. Essa cultura foi incubada a 37 °C sob agitação de 250 rpm até atingir a DO₆₀₀ 0,3 – 0,4. Após atingir a DO necessária, a cultura foi dividida em tubos de polipropileno de 1,5 mL. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 2000 x g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1/10 do volume da solução 1 x TSS. Os tubos foram colocados em banho de gelo por 10 minutos e logo em seguida foram estocados a -80 °C.

4.13 Transformação da bactéria competente BL21-AI com os plasmídeos pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro, pRSET-A Opt OmpA Cro

As bactérias competentes BL21-AI preparadas pelo método 1 x TSS foram descongeladas em gelo durante 15 minutos. Após o descongelamento foi adicionado 100 ng de cada plasmídeo, pRSET-A Cro; pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro. Os plasmídeos ficaram interagindo com a bactéria durante 30 minutos. Em seguida, foram acrescentados 900 µL de meio SOC. As bactérias foram incubadas por 1 hora e 30 minutos e depois foram plaqueadas em placas LB ágar com ampicilina (100 µg/mL).

4.14 Expressão de BL21-AI utilizando os plasmídeos pRSET-A Cro, pRSETA OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro

Uma colônia de BL21-AI transformada com cada tipo de plasmídeo (pRSET-A Cro; pRSET-A OmpA Cro; pRSET-A e Opt OmpA Cro) foi crescida em 5 mL de meio TB com ampicilina 100 µg/mL. A cultura foi crescida *por* 16h – 18h a 37 °C sob agitação de 250 rpm. A cultura foi diluída para uma DO₆₀₀ 0,1 em 30 mL de meio TB com ampicilina (100 µg/mL). Seus crescimentos foram monitorados por leitura em espectrofotômetro (Bio Photometer plus - Eppendorf) até chegar a uma DO₆₀₀ = 0,4–0,6. Após atingir a DO₆₀₀ desejada retirou-se 1 mL de cada cultura para verificar a expressão basal. A cultura bacteriana foi induzida com 0,2% de arabinose a 250 rpm

a 37 °C. A indução foi realizada durante um período de 3 horas, após esse período foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada cultura. Cada uma das alíquotas foi centrifugada a 12000 x g por 10 minutos e os sobrenadantes foram descartados. As células bacterianas foram ressuspensas em tampão de amostra 2 x SDS. O restante da cultura foi centrifugada em tubo de polipropileno de 50 mL a 2600 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi guardado em -80 °C. O resultado da expressão foi analisado em gel de SDS-PAGE e Western Blotting (citar item).

4.15 Análise da Expressão com diferentes tempos de indução e temperatura

Colônias isoladas de BL21-AI transformadas com os vetores em BL21-AI utilizando os vetores plasmídeos pRSET-A Cro, pRSETA OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro foram crescidas por 16h – 18h segundo o protocolo já descrito acima e no dia seguinte utilizadas como pré inoculos em 30 mL de meio TB e crescidos até alcançarem $DO_{600} = 0,6$. As culturas foram separadas em dois lotes previamente à indução, sendo que uma cultura foi mantida a 30 °C e outra a 37 °C e induzidas com 0,2% de arabinose. Após 3 horas de indução foram coletadas alíquotas de cada transformação. As culturas foram mantidas em ambas as temperaturas *overnight* quando o material foi coletado em alíquotas de 1 mL. As alíquotas foram centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos e o meio de cultura foi descartado. As células bacterianas foram ressuspensas em tampão de amostra 2 x SDS e reservadas para análise em gel de SDS-PAGE e Western Blotting. O restante das alíquotas das culturas foram centrifugadas em tubo de polipropileno de 50 mL a 2600 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi guardado em -80 °C. Posteriormente as alíquotas foram descolgeladas e sonicadas. O lisado foi centrifugado separando o sobrenadante do precipitado que foram utilizados na preparação de amostras em tampão 2 x SDS e reservadas para análise em gel de SDS-PAGE e Western Blotting.

4.16 Sequenciamento

Os genes sintéticos foram sequenciados em aparelho Sequenciador 3500 da Applied Biosystems. A metodologia do sequenciamento foi feita no Centro de Toxinas, Resposta-Imune e Sinalização Celular – CETICS – Instituto Butantan.

Para realizar o sequenciamento foi utilizado o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit. O kit Big dye é constituído de nucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), buffer, cloreto de magnésio, Ampli Taq DNA polimerase FS e os dideoxynucleotídeos (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) ligados à moléculas fluorescentes de alta sensibilidade denominadas dicloro-rodaminas. As dicloro-rodaminas são moléculas aceptoras de fluorescência e são ligadas por sua vez a moléculas 6-carboxi-fluoresceína (6 FAM), doadoras de fluorescência.

Para preparar a amostra de cada plasmídeo (pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro) foram utilizadas 150 ng de plasmídeo, 1,6 pmol de *primer* T7 *forward* e o volume final foi ajustado para 10 µL com H₂O Mili Q.

De cada amostra preparada foram transferidos 6 µL para a placa e foram adicionados 2 µL de *Big Dye* e 1 µL de 5x *Sequencing Buffer* e 1 µL de H₂O Milli Q, a placa foi selada e em seguida foi colocada em termociclador.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando um ciclo de incubação a 96 °C por 1 minuto. Foram feitas 25 ciclagens de denaturação a 96 °C por 10 segundos, anelamento a 50 °C por 5 segundos e extensão a 60 °C por 4 minutos. Após o término das ciclagens, a placa foi retirada do termociclador e armazenada a 4 °C.

Em seguida, foi feita uma precipitação com EDTA/Etanol. O EDTA ajuda a estabilizar os produtos de extensão e ajuda a lavar os corantes não incorporados na reação.

Em cada poço foram adicionados 2,5 µL de EDTA (125 mM) e cada poço foi bem homogeneizado. Foram adicionados 30 µL de etanol 100% gelado. A placa foi selada novamente e homogeneizada levemente. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos protegida da luz. Em seguida foi centrifugada a 2500 x g por 30 minutos.

O conteúdo da placa foi imediatamente descartado e levemente seco em papel absorvente. Em cada poço foi adicionado 30 µL de etanol 70% seguido de homogeneização. Foi feita uma centrifugação a 2500 x g por 15 minutos e o conteúdo da placa foi descartado. A placa foi envolvida em papel absorvente e então foi feita uma centrifugação a 185 x g por 1 minuto para secar. As amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida e em seguida a placa foi selada e homogeneizada durante 15 segundos. A placa voltou ao termociclador para um único ciclo de denaturação, a denaturação foi feita a 95 °C por 5 minutos e foi deixada a 4 °C por 3 minutos.

As amostras foram colocadas no sequenciador, que aspira as amostras por um sistema de condução elétrica (injeção eletrocinética) para um capilar que apresenta em seu interior um polímero (POP-6TM polymer - Applied Biosystems, USA), que permite que as moléculas de DNA migrem ao longo do mesmo, quando submetidas à eletroforese. As moléculas são “aspiradas” pelo sistema capilar em ordem crescente de tamanho, uma vez que moléculas menores têm maior facilidade de migrarem pelo polímero. No capilar há uma região denominada de “janela” que permite que um feixe de laser passe pelo capilar e atinja diretamente as moléculas. Quando o laser incide sobre as moléculas de rodaminas ligadas ao di-deoxinucleotídeos, estas emitem fluorescência que é captada por um sistema de filtros virtuais. Como cada uma das rodaminas apresenta capacidade de emitir fluorescência em comprimentos de onda diferentes, o filtro virtual consegue diferenciá-las e determinar a cada um destes espectros uma coloração específica. Assim, o ddATP é representado como verde, o ddCTP como azul, o ddGTP como preto e ddTTP como vermelho e são apresentados nestas mesmas cores no eletro-ferograma para identificação da sequência gênica analisada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Abaixo serão apresentados os resultados obtidos com a expressão de crotamina recombinante. No presente trabalho foram construídos três genes sintéticos para a expressão da crotamina madura no citoplasma e periplasma de cepas de *E. coli* BL21 (DE3) e BL21-AI.

5.1 Estratégia de Clonagem

A estratégia de clonagem permite múltiplas aplicações, os plasmídeos replicados construídos para expressão em citoplasma e periplasma devem ser amplificados em uma linhagem de *E. coli* que não contém a RNA polimerase do fago T7 para evitar o escape da indução. As expressões podem ser feitas em uma linhagem bacteriana que contenha a RNA polimerase do fago T7 sob o controle de um promotor indutível como *lacUV5*, que é induzido por IPTG, ou sob o controle de um promotor indutível como o *araB*, que é induzido por arabinose.

O gene construído para expressão citoplasma permite expressar a crotamina no citoplasma de cepas BL21(DE3) na forma de corpúsculo de inclusão ou também pode ser expressa em cepas mutantes como BL21(DE3) origami com citoplasma oxidativo a fim de obter a proteína recombinante com sua correta formação das pontes dissulfeto. O mesmo vetor pode ser ainda utilizado em hospedeiros com outros tipos de indução fortemente regulados como, por exemplo, BL21-AI (Figura 15).

Os genes construídos para expressão em periplasma permitem expressar a crotamina no espaço periplasmático utilizando cepas como BL21(DE3) que são induzidas por IPTG. Por se tratar de uma indução forte, a produção de proteína pode gerar corpúsculo de inclusão o qual pode ser renaturado através de técnicas de alta pressão, outra alternativa seria expressar a crotamina recombinante em cepas que utilizam promotores fortemente regulados como a bactéria BL21-AI que é induzida por arabinose e pode ser titulável (Figura 15).

Figura 15 – Cepas bacterianas que podem ser utilizadas para expressão de crotamina recombinante em citoplasma e periplasma

5.2 Construção do vetor pRSET-A Cro para expressão de crotamina no citoplasma de *E.coli*

Para a expressão da crotamina no citoplasma, a sequência codificante do peptídeo maduro teve seus códons raros otimizados de acordo com os códons preferenciais de *E. coli* e foi inserida no vetor de expressão pRSET-A com uma curta cauda de fusão contendo 6 x HIS e um sítio de clivagem para enteroquinase, a fim de substituir a proteína de fusão original do vetor tendo o cuidado de manter o novo cassete com o mesmo RBS e a mesma distância em relação ao sítio do promotor T7 e o início da transcrição, também mantendo a fase de leitura em relação ao ATG e ao promotor T7. A crotamina foi clonada entre os sítios de *NdeI* e *XhoI*. Logo após o sítio de *NdeI*, foi colocado a cauda de fusão de histidina (6 x HIS) e o sítio de enteroquinase (EK). Após o sítio de *XhoI* foram adicionados dois códons de terminação.

A construção dirigida para o citoplasma possui uma cauda de fusão de histidina na região N-terminal, o que permite a purificação da proteína recombinante.

Esta cauda de fusão também apresenta um sítio de clivagem de enteroquinase, e ao usar esta enzima, a proteína de fusão é clivada liberando a crotamina madura sem adição de aminoácidos na porção N-terminal. Esta construção resultou no vetor pRSET-A Cro, que pode ser vista na figura 16.

Figura 16 – Vetor para expressão de crostamina recombinante em citoplasma. A cor roxa representa o promotor T7, em uma caixa lilás está o RBS. Em vermelho destaca-se o *start* códon presente no sítio da enzima de restrição *NdeI*. Em rosa está a cauda de 6 x HIS e o sítio de enterocinase. Em laranja está a sequência da crostamina madura fusionada a cauda de 6x HIS + EK. O *stop* códon está indicado por uma caixa salmão.

5.3 Construção dos vetores pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt Omp Cro para produção de crotamina no periplasma de *E.coli*

Para a expressão no periplasma, também foi utilizada a porção da crotamina madura. Por se tratar de uma proteína secretada no lúmen da glândula de veneno há a presença de um peptídeo sinal. Os sistemas de secreção eucarióticos diferem dos procarióticos (GASCUEL; DANCHIN, 1986), por isso seus peptídeos sinais são diferentes, ainda que existam exceções em que alguns peptídeos sinais eucarióticos funcionam bem em sistemas procarióticos (HUMPHREYS et al., 2000). Foi decidido trocar a sequência líder da toxina da serpente pela sequência sinal de translocação da OmpA bacteriana por ser o peptídeo sinal eficiente e amplamente estudado (LOW et al., 2013; PINES; INOUE, 1999). A sequência líder de OmpA foi colocada à jusante à sequência da crotamina madura. Na região N-terminal de OmpA foi colocado o sítio de *NdeI* e na região C-terminal da crotamina uma lisina C-terminal foi substituída por um códon de terminação TAA e acrescentado um sítio de restrição *XhoI*. A inserção do cassete no vetor pRSET A substitui toda cauda de fusão original, mas mantém a distância do *start* códon em relação ao promotor e seu RBS, de forma que a fase de leitura da proteína recombinante seja apropriada.

A construção para expressão em periplasma resultou em dois plasmídeos, um vetor com apenas a sequência da crotamina madura otimizada, a sequência do peptídeo sinal da OmpA foi mantida em sua forma natural. O vetor resultante foi denominado de pRSET-A OmpA Cro e pode ser visto na figura 17.

Um segundo vetor teve os códons substituídos pelos códons preferenciais de *E. coli*, tanto no peptídeo sinal de OmpA como na parte da crotamina madura, e recebeu o nome de Opt OmpA Cro. Os dois cassetes de expressão podem ser comparados na figura 13.

Essas mudanças foram realizadas, pois foi encontrado na literatura que se o peptídeo sinal fosse otimizado poderia melhorar a quantidade de expressão da proteína recombinante (ZALUCKI et al., 2007), porém outros autores defendem a não otimização do peptídeo sinal afirmando que os códons raros são muito importantes para a tradução e correto dobramento das proteínas (THANARAJ; ARGOS, 1996). Zalucki et al., (2007) conseguiram expressar a sequência sinal de *bla* e fizeram algumas otimizações em seus códons raros. As otimizações ocorreram na região C-terminal do peptídeo sinal e o resultado obtido foi um aumento na

expressão da sequência sinal de *bla* quando comparado com a sequência nativa. Porém, o mesmo não ocorreu para a expressão de MBP (*Maltose Binding Protein*) que teve sua expressão bastante reduzida com a otimização de todos os códons raros de seu peptídeo sinal (ZALUCKI; JENNINGS, 2007).

Figura 17 – Vetor para expressão de crotonina recombinante em periplasma. A cor lilás representa o promotor T7, em uma caixa lilás está o RBS. A cor vermelha destaca o *start* códon presente no sítio da enzima de restrição *NdeI*. A cor amarelo representa o peptídeo sinal de OmpA e a cor laranja destaca a crotonina madura. O *stop* códon está indicado por uma caixa salmão.

5.4 Extração dos plasmídeos pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro em TOP10

Os plasmídeos que foram transformados em bactérias TOP10 e submetidos ao protocolo de Miniprep foram aplicados em gel de agarose 1,2%. Esse protocolo foi realizado para certificar a presença dos vetores de expressão pRSET-A Cro (linha 3); pRSET-AOmpA Cro (linha 4) e pRSET-AOpt OmpA Cro (linha 5). Foi utilizado o peso molecular de 1 Kb da Invitrogen. O resultado foi analisado em transluminador de luz UV (BioDocAnalyze – Biometra). Através do gel foi possível confirmar que os plasmídeos estão na altura correta de aproximadamente 3 Kb (Figura 18).

Figura 18 – Extração dos plasmídeos da bactéria TOP 10 (Miniprep): linha 1: Marcador 1Kb (Invitrogen); linha 2: Ø; linha 3: pRSET-A Cro; linha 4: pRSET-A OmpA Cro; linha 5: pRSET-A Opt OmpA Cro.

5.5 Dupla Digestão Enzimática dos plasmídeos pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro contendo o inserto de crotamina.

Para confirmar a presença dos insertos de crotamina no vetor pRSET-A foi feita uma análise de restrição utilizando as endonucleases de restrição *XbaI* + *BamHI* e *XbaI* + *HindIII*. No vetor pRSET-A utilizado como controle, a digestão com as enzimas *XbaI* + *BamHI* resultou em um inserto com tamanho esperado de 144 pb. A outra digestão feita com *XbaI* + *HindIII*, foi possível observar um inserto de tamanho esperado com 185 pb. Os plasmídeos contendo as construções e o inserto de crotamina (pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro) também foram submetidos ao método de dupla digestão enzimática. Utilizando as enzimas de digestão *XbaI* + *HindIII* pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro foram observados tamanhos de fragmentos esperados para os três plasmídeos, pRSET-A Cro com 243 pb, pRSET-A OmpA Cro com 270 pb e pRSET-A Opt OmpA Cro com 270 pb. Utilizando as enzimas *XbaI* e *BamHI* foi possível apenas linearizar o vetor, pois o sítio de *BamHI* é perdido no vetor original, indicando a substituição pelo inserto contendo crotamina, como pode ser observado na figura

19.

Figura 19 – Dupla digestão enzimática dos plasmídeos contendo o inserto de crotamina resultando em fragmentos de tamanhos esperados. M= marcador; nd= Não digerido; X= *XbaI*; B= *BamHI*; H= *HindIII*

5.6 Expressão de pRSET-A Cro x BL21(DE3)

As primeiras análises foram feitas utilizando a construção para expressão em citoplasma (pRSET-A Cro) na hospedeira BL21(DE3). A fim de confirmar se a expressão da crotamina recombinante foi bem sucedida, foram realizados ensaios de SDS-PAGE e Western Blotting utilizando extratos totais bacterianos. Para realizar o procedimento foi utilizado o anticorpo primário de coelho anti-crotamina e o anticorpo secundário utilizado foi o anti-coelho conjugado com HRP da Santa Cruz.

O anticorpo anti-crotamina reconheceu a proteína em nossos controles, veneno bruto e crotamina purificada. Também reconheceu bandas na altura da crotamina nos extratos bacterianos induzidos (i1h; i2h; i3h; i4h). Há também reconhecimento de bandas na altura da crotamina no extrato bacteriano não induzido de 4 horas (Nh4). Provavelmente, após longo período de crescimento houve a produção de T7 RNA polimerase e a consequente expressão da proteína recombinante mesmo sem adição do indutor IPTG.

Porém, o anticorpo anti-crotamina reconhece as mesmas bandas na bactéria BL21 (DE3) vazia (sem plasmídeo - $\emptyset$) e na bactéria BL21 (DE3) com plasmídeo (sem indução - pRSET-A). Dessa forma, não é possível afirmar com certeza se houve ou não expressão da crotamina recombinante nos extratos totais induzidos (Figura 20).

Figura 20 – Expressão de pRSET-A Cro x BL21(DE3). Western blotting realizado com o anticorpo primário anti-crotamina (1:4000) e anticorpo secundário HRP anti-coelho (1:500). Linha 1: Marcador de peso Molecular (M) - 198 KDa a 3 KDa ; Linha 2: Veneno bruto; Linha 3: Crotamina Purificada; Linha 4: Bactéria BL21 (DE3) vazia (Ø); Linha 5: Bactéria BL21 (DE3) com plasmídeo (pREST-A CRO), Linha 6: Indução de 1 hora (i1h); Linha 7: Indução de 2 horas (i2h); Linha 8: Indução de 3 horas (i3h); Linha 9: Não induzido de 4 horas (N4h); Linha 10: Indução de 4 horas (i4h)

Com base nos dados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho, não foi possível confirmar a expressão da crotamina recombinante no citoplasma da cepa bacteriana BL21(DE3) de *E.coli*, devido à ligação inespecífica do anticorpo anti-crotamina. Temos indícios de que no sistema pRSET-A induzido por IPTG está havendo toxicidade à célula bacteriana, instabilidade no vetor ou problemas na transformação do hospedeiro, como será discutido a seguir na seção 5.8.

5.7 Redução da reatividade cruzada do anticorpo anti-crotamina e Dot Blot

Como foi demonstrado, houve ligação inespecífica à proteínas bacterianas do anticorpo anti-crotamina. O soro de animais imunizados contém elevados níveis de anticorpos dirigidos contra antígenos bacterianos, devido à presença de bactérias no

trato gastro intestinal, conduzindo a um elevado *background* na análise da expressão em *E. coli*. Para tentar diminuir a inespecificidade do anticorpo anti-crotamina foi feita a redução da reatividade do anticorpo baseado no método de Gruber e Zingales (1995). O procedimento proposto consiste na interação do anticorpo com o precipitado bacteriano. A cultura bacteriana que foi crescida a 37 °C foi dividida em duas partes, uma para ser tratada com formaldeído 0,5% que preserva a estrutura das proteínas da parede celular e a outra para ser autoclavada, que aglutina todas as proteínas da *E. coli* inclusive as intracelulares (GRUBER; ZINGALES, 1995). O formaldeído foi utilizado para fixar os antígenos na superfície bacteriana e o passo de autoclavagem melhora a exposição os antígenos mais internos, especialmente lipopolissacarídeos (GRUBER; ZINGALES, 1995).

Após a redução da reatividade cruzada do anticorpo primário foi realizado o experimento de Dot Blot para detectar qual a melhor concentração dos anticorpos primário e secundário e observar se não há reatividade cruzada entre o anticorpo primário e o extrato bacteriano. A tira AB (controle) indica a afinidade do anticorpo secundário anti-coelho conjugado com HRP (GE) pelo anticorpo primário anti-crotamina. A tira EC (controle) que foi incubada somente com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com HRP indica a reatividade cruzada do anticorpo secundário com o extrato bacteriano de *E. coli*. As concentrações do anticorpo secundário usadas foram 1:1000; 1:2000 e 1:4000. As tiras experimentais AG indicam as concentrações mínimas de antígeno (crotamina purificada) detectadas pelos anticorpos primário e secundário. As concentrações do anticorpo primário anti-crotamina usadas foram 1:2000; 1:4000 e 1:8000. As concentrações do anticorpo secundário anti-coelho conjugado com HRP usadas foram 1:1000; 1:2000 e 1:4000.

A figura 21 mostra que não há reatividade cruzada entre o anticorpo secundário e o extrato bacteriano de *E. coli* (EC controle). Essa figura também demonstra que o anticorpo primário em uma concentração de 1:4000 e o anticorpo secundário em uma concentração 1:2000 consegue detectar 1 ng de crotamina (Seta vermelha). É possível observar que não há reatividade cruzada entre o anticorpo secundário e o extrato bacteriano de *E. coli* nem no grupo controle nem nos grupos experimentais. Nota-se que há um sinal forte de detecção mesmo o anticorpo primário diluído em 1:8000 e o anticorpo secundário diluído em 1: 4000 porém a quantidade de antígeno reconhecida é maior. Esse resultado demonstra

que a melhor concentração do anticorpo primário anti-crotamina a ser usada é 1:4000 e a concentração do anticorpo secundário anti-coelho conjugado com HRP (GE) é 1:2000.

Figura 21 – Concentração do anticorpo primário após redução da reatividade cruzada. A tira AB (controle) mostra a quantidade de antígeno (crotamina) que o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com HRP reconhece na concentração de 1:1000. A tira EC (controle) indica a reatividade cruzada do anticorpo secundário com o extrato bacteriano. A seta vermelha indica a quantidade mínima de crotamina reconhecida pelo anticorpo primário na concentração de 1:4000 e o secundário na concentração de 1:2000.

5.8 Expressão em BL21-AI utilizando os plasmídeos pRSET-A Cro, pRSETA OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro

Para esse experimento foram usados os três plasmídeos construídos (pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro). A expressão da crotamina

recombinante foi realizada utilizando 0,2% de arabinose a 250 rpm a 37 °C. A indução da proteína recombinante foi feita durante 3 horas. Para confirmar se a expressão da crotamina recombinante foi bem sucedida, foi feito Western Blotting, utilizando o anticorpo primário anti-crotamina (1:4000) e o anticorpo secundário HRP anti-coelho GE (1:2000) contra extratos totais de BL21-AI induzida e transformada com os 3 vetores (figura 22). O anticorpo primário reconheceu a banda da crotamina em nossos controles (veneno bruto e crotamina purificada). O anticorpo anti-crotamina também detectou bandas na mesma altura dos controles utilizados. O anticorpo primário não reconheceu bandas na altura da crotamina no extrato bacteriano não induzido. O resultado da expressão mostra que foi possível expressar os três vetores nas condições citadas acima.

Figura 22 – Expressão dos vetores pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro em BL21-AI. Western Blotting realizado com o anticorpo primário anti-crotamina (1:4000) e anticorpo secundário HRP anti-coelho GE (1:2000). Linha 1: Marcador de peso Molecular SeeBlue Invitrogen (M); Linha 2: Veneno bruto; Linha 3: Crotamina Pura; Linha 4: Bactéria BL21-AI vazia (Ø); Linha 5: Indução de 3 horas pRSETA-Cro; Linha 6: Indução de 3 horas pRSETA-OmpA-Cro; Linha 7: Indução de 3 horas pRSETA-Opt-OmpA-Cro

A expressão do vetor pRSET-A Cro em BL21-AI parece ser menor do que a observada em BL21(DE3) (Figura 20) induzido por IPTG, demonstrando que foi possível produzir crotamina recombinante (Figura 22) utilizando uma curta cauda de fusão de 6 x HIS e sítio de EK. Corroborando com estes dados, Vu et al., (2014)

produziram crotamina recombinante otimizada com uma pequena cauda de fusão (6 x HIS + sítio de TEV) em baixa temperatura, entretanto a expressão e solubilidade da proteína foram muito baixas. Além disso, utilizando uma cauda de fusão MBP, foi possível alcançar altos níveis de expressão de crotamina recombinante.

Utilizando os vetores construídos para expressão em periplasma (pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro), observa-se que foi possível produzir crotamina recombinante (Figura 22) em fusão com o peptídeo sinal bacteriano OmpA. Esse resultado também nos mostra que a produção de crotamina recombinante permaneceu semelhante usando o vetor com peptídeo sinal otimizado (pRSET-A Opt OmpA Cro) e o vetor com peptídeo sinal nativo (pRSET-A OmpA Cro). Ao otimizar todo o peptídeo sinal de MBP, Zalucki e Jennings (2007) obtiveram uma expressão muito baixa da proteína quando comparada com a proteína nativa.

5.8.1 Expressão dos vetores pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro, pRSET-A Opt OmpA Cro em cepa bacteriana BL21-AI com diferentes tempos de indução e temperatura

Foi verificada a expressão de crotamina recombinante utilizando os 3 vetores procurando identificar a expressão periplasmática e citoplasmática utilizando como hospedeira BL21-AI. A análise da expressão foi conduzida a 37 °C e a 30 °C, com e sem indução por arabinose. Para confirmar a expressão de crotamina recombinante foram analisadas alíquotas dos extratos totais das amostras induzidas. Aliquotas idênticas foram sonicadas e amostras do sobrenadante e do precipitado foram separadas por SDS-PAGE e analisadas por Western Blotting (Figura 23).

Como apresentado na figura 23, nota-se que houve expressão nos extratos totais contendo a sequência líder otimizada de OmpA, tanto em 3 horas quanto após 16h em ambas as temperaturas. A 37° C a proteína recombinante foi detectada apenas no precipitado do sonificado, não aparecendo no sobrenadante. Na indução por 24 horas não houve incremento da proteína recombinante detectada nos extratos totais e não se detectou banda reativa no sobrenadante e no precipitado do sonificado.

Figura 23 – Expressão de BL21-AI x pRSETA Opt OmpA Cro. Apresenta os diferentes tempos de indução a 37 °C e 30 °C. Linha 1: Marcador de peso molecular SeeBlue Invitrogen; linha 2: crotamina pura; linha 3: Bactéria Ø; linha 4: Extrato total não induzido (NI-Ext 3h); linha 5: sobrenadante não induzido (NI-S 3h); linha 6: Precipitado não induzido (NI-P 3h); linha 7: Extrato total induzido (I-Ext 3h); linha 8: Sobrenadante induzido (I-S 3h); linha 9: Precipitado induzido (I-P 3h); linha 10: Extrato total induzido (I-Ext 24h); linha 11: Sobrenadante induzido (I-S 24h); linha 12: Precipitado induzido (I-P 24h).

A 30 °C a expressão em 3 horas foi menor, mas podemos verificar uma banda reativa no sobrenadante do sonificado da cultura induzida por 3 horas. Com 24 horas só se detecta a banda no precipitado do sonificado da cultura induzida.

É sabido na literatura que a degradação de proteínas com dobramento incorreto pode ocorrer em uma menor taxa a 30 °C do que a 37 °C (KOSINSKI; BAILEY, 1991). Se houve degradação da proteína insolúvel aconteceu após a sonicação. Por outro lado parece que não há clivagem do peptídeo sinal mantendo a proteína nascente presa à membrana celular ou agregada, sendo apenas presente

nos precipitados insolúveis, razão pela qual não tentamos isolar a crotamina recombinante por choque osmótico liberando o fluido periplasmático.

5.9 Problemas com instabilidade na expressão da crotamina recombinante

As expressões realizadas para produção de crotamina recombinante não ocorreram de forma constante em diversos experimentos repetidos, talvez devido a algum tipo de atividade tóxica da proteína recombinante na célula hospedeira, pois obtínhamos poucos clones, o crescimento das culturas era irregular e não se encontrava proteína recombinante após a indução. É bom lembrar que uma característica inerente da crotamina é interagir fortemente com DNA e penetrar membranas celulares. Isso pode interferir com processos essenciais da célula hospedeira.

Um dos motivos poderia ser escape precoce da RNA polimerase de T7, sem indução. Nos sistemas de expressão baseados em T7 (STUDIER et al., 1990), o genoma bacteriano contém uma inserção (DE3) do fago T7 para expressar a RNA polimerase viral sob o controle do promotor de LacUV. Na frente do promotor existe um sítio operador aonde se liga a proteína repressora (expressa pelo gene *LacI*). Quando da adição de IPTG o repressor se liga ao operador e a RNA polimerase de T7 é expressa de forma a encontrar o promotor de T7 presente no vetor pRSET-A, induzindo a expressão da proteína recombinante. Entretanto, pode haver o chamado escape em que pequenas quantidades de RNA polimerase de T7 expressa mesmo na ausência do indutor e como a RNA polimerase de T7 é 700 vezes mais ativa que a RNA polimerase 2 de *E. coli* pode haver expressão imediata da proteína recombinante e consequentemente a não obtenção de clones na placa de seleção. Os clones isolados resistentes a ampicilina poderiam ser justamente os que não expressavam crotamina.

Ao pensar em alternativas para o sistema de expressão comparamos o vetor pRSET-A com o vetor pET 28 e reparamos que diferente do sistema pET os vetores pRSET após o promotor de T7 não contém a sequência do operador *lac* aonde se liga a proteína repressora *lacI*. No caso dos sistemas pET os vetores são duplamente controlados, pois existe um operador *lac* no genoma da bactéria após o promotor de LacUV e a mesma sequência após o promotor de T7 no próprio vetor.

Pela falta do operador de LacI no vetor pRSET-A se recomenda que em caso de escape da RNA polimerase T7 se use cepas de BL21(DE3) x pLys-S ou pLys-E como se mostra na figura abaixo:

Figura 24 – Comparação do Sistema pRSET com o sistema pET. A figura mostra a regulação da indução da RNA polimerase de T7 via IPTG. Note a ausência do *Lac o* após o promotor de T7 no vetor.

Entretanto, o mesmo problema pode ser circundado utilizando-se o sistema BL21-AI. Neste sistema, a RNA polimerase de T7 também está inserida no genoma bacteriano, mas sob o controle de um promotor de *araB*. Este tipo de promotor é titulável, ou seja ele responde a concentrações crescentes do indutor arabinose e é fortemente regulado não havendo escape.

Mas foram encontrados os mesmos problemas de instabilidade em BL21-AI. As transformações resultavam em poucos clones. Suspeitamos de problemas em protocolos de transformação e repetimos diversas vezes com diferentes métodos de transformação. Cepas comerciais pré-competentes de BL21(DE3) e BL21-AI foram adquiridas diversas vezes e o problema persistiu. Poucos clones eram obtidos pós-transformação no meio seletivo. Os pré-inóculos cresciam mal e quando induzidos algumas vezes expressavam poucas quantidades de proteína recombinante ou não expressavam. Os resultados com BL21-AI foram aparentemente melhores, mas a indução com variação de temperatura ou com diferentes concentrações de arabinose teve efeitos esperados.

Como foi notada uma certa instabilidade dos vetores, gerando poucos clones resistentes a ampicilina capazes de expressar crotamina, os vetores foram seqüenciados novamente a fim de verificar se as construções estavam corretas.

Na tentativa de fazer novas minipreps percebemos que tivemos problemas de transformar bactérias DH5 α e TOP10. Não foi possível recuperar DNA plasmidial que provavelmente estava degradado. Por essa razão, recorremos aos estoques originais e novas minipreps foram sequenciadas.

A fim de certificar se a subclonagem no plasmídeo de expressão pRSET-A havia sido feita de forma correta, os três genes sintéticos (pRSET-A Cro, pRSET-A OmpA Cro e pRSET-A Opt OmpA Cro) foram submetidos a metodologia de sequenciamento de Sanger. Através dessa técnica foi possível verificar que todos os genes sintéticos foram subclonados de forma correta. Todas as sequências de DNA foram verificadas base por base a fim de confirmar que nenhuma alteração ocorreu nas bases e por consequência nenhum aminoácido foi modificado.

A figura 25 representa o sequenciamento do vetor para a expressão da crotamina recombinante em citoplasma mostrando a sequência da toxina madura em fusão com a cauda de 6x histidinas e o sítio de enteroquinase (EK). Destaca também aonde foram posicionados os sítios de restrição *NdeI* e *XhoI* e os dois códons de terminação TAA.

As figuras 26 e 27 representam os sequenciamentos dos vetores feitos para a expressão da crotamina recombinante em periplasma mostrando a sequência madura da proteína em fusão com o peptídeo sinal bacteriano OmpA. Destaca

também aonde foi posicionado os sítios de restrição *NdeI* e *XhoI* e os dois códons de parada TAA.

Figura 25 – Sequenciamento do plasmídeo construído para expressão em citoplasma pRSET-A Cro.

pRSET-A OmpA CRO

Figura 26 – Sequenciamento do plasmídeo construído para expressão em periplasma pRSET-A OmpA Cro. Otimização somente da crotamina madura, o peptídeo sinal OmpA permanece idêntico a sequência nativa

pRSET-A Opt OmpA CRO

Figura 27 – Sequenciamento do plasmídeo construído para expressão em periplasma pRSET-A Opt OmpA Cro. Otimização do peptídeo sinal de OmpA e da crotonina madura

Tendo certeza de que os plasmídeos estavam corretos e tendo identificado que o principal problema tinha sido utilizar DNA plasmidial provavelmente degradado, foram iniciados novos experimentos com DNA plasmidial recém extraídos e novas cepas de BL21-AI competentes utilizando a construção para expressão citoplasmática e o vetor pRSET-A Cro.

A transformação se mostrou altamente eficiente e foram selecionadas colônias para fazer novos ensaios de expressão.

Figura 28 – Expressão do vetor pRSET-A Cro x BL21-AI. Western blotting realizado com o anticorpo primário anti-crotamina (1:4000) e anticorpo secundário HRP anti-coelho (1:2000). Marcador de massa molecular (M) as massas do padrão estão indicadas em kDa; Extrato total não induzido (NI); Extratos totais induzidos (EXT induzido) 1h; 2h; 3h e 4h; Lisados do sonicação (sonicado 4h): precipitado (P) e sobrenadante (S); Lisados do sonicação (sonicado 24h): precipitado (P) e sobrenadante (S).

Na figura 28, pode-se verificar a presença de bandas reativas nas culturas induzidas. Entretanto, os extratos totais das aliquotas coletadas entre o período de 1 hora e de 4 horas de indução mostram uma massa molecular aparentemente mais alta que o esperado. É interessante notar que ao sonicar e lisar a cultura apareceram duas bandas reativas, uma na massa esperada da crotamina e outra idêntica ao extrato total. O mesmo ocorreu no lisado após indução durante 24 horas. Os sobrenadantes não mostram bandas detectadas pelo anticorpo anti-crotamina.

Pode-se concluir que a construção pRSET-A Cro expressa crotamina recombinante provavelmente em corpúsculos de inclusão, mas parece que a crotamina nos extratos totais antes da lise migra de forma anômala. É conhecido que crotamina tem alta afinidade por proteoglicanos e formam agregados moleculares com DNA resistentes a SDS dependendo da força iônica (CHEN et al., 2012). Esse fenômeno é evidente comparando extratos totais antes e após a sonicação.

Ainda que haja interesse em obter crotamina recombinante na sua forma nativa, seja por renaturação, por expressão no periplasma, ou utilizando cepas de citoplasma oxidativo do tipo BL21(DE3) *origami*, um de nossos principais objetivos era obter crotamina recombinante na forma de corpúsculos de inclusão, pois consideramos que esses toxoides são bons imunógenos, aumentando os títulos de anticorpos no soro policlonal. Sabe-se que a crotamina nativa do veneno é pouco imunoreativa, produz baixo título de anticorpos e parece imunossuprimir os coelhos (informação pessoal PRIETO DA SILVA), sendo que os animais em que se tenta produzir soro geralmente apresentam caquexia acentuada. Em modelo vivo, animais tratados com crotamina perderam peso (PEREIRA et al., 2011). A produção em corpúsculos poderia reduzir esse efeito tóxico da crotamina e o agregado protéico é conhecido por estimular o sistema fagocitário e imune.

Assim, consideramos que obter crotamina recombinante em *E. coli* é uma estratégia viável. Entretanto, verificamos ser importante utilizar sistemas de indução fortemente regulados, principalmente quando baseados em promotores do tipo fago T7, pois não podemos excluir que a crotamina tenha efeitos deletérios no interior da célula hospedeira.

As melhores perspectivas para alcançar eficiente expressão recombinante de crotamina em um sistema procariótico, devem considerar além da escolha do sistema de indução ou da célula hospedeira, também a escolha da cauda de fusão.

As construções obtidas neste trabalho visavam obter crotamina idêntica à nativa ou com caudas de fusão mínimas, capazes de auxiliar na purificação do produto recombinante por afinidade metálica, sem provocar nenhuma alteração no N-terminal da sequência da proteína após a excisão da cauda de 6 x His. Entretanto, levando em conta estes resultados é possível que proteínas de fusão maiores possam melhorar a expressão da crotamina, tanto facilitando sua obtenção, quanto aumentando seus níveis de expressão e principalmente reduzindo sua agregação ou interação com outras moléculas bacterianas, reduzindo assim seus efeitos tóxicos na célula hospedeira e obtendo-se resultados mais consistentes. Uma possibilidade seria utilizar a crotamina em fusão com a proteína *Ubiquitin-like protein* SMT3 de *Saccharomyces cerevisiae*, sistema que é indicado para expressar eficientemente

proteínas nativas após clivagem por SUMO-protease, que reconhece a estrutura tridimensional correta da proteína de fusão (LEE et al., 2008; YUNUS; LIMA, 2009).

6 CONCLUSÃO

Foi possível expressar crotamina utilizando os 3 vetores. A utilização de cepas BL21-AI, cujo promotor é fortemente regulado pelo indutor arabinose, mostrou resultados mais consistentes na expressão da proteína recombinante. Para detecção da crotamina recombinante foi necessário reduzir a reatividade inespecífica do soro policlonal anti-crotamina, que foi capaz de reconhecer 1 ng de crotamina em diluições de 1: 4000.

As construções para expressão periplasmática utilizando o vetor pRSET-A OmpA Cro e o vetor pRSET-A Opt OmpA Cro, cuja principal diferença é a otimização dos códons raros presentes no peptídeo sinal, não parecem afetar a expressão da proteína recombinante. Tempos de indução de 24 horas, quando comparado com induções de 3 horas, parecem promover a degradação da proteína recombinante, efeito que é diminuído reduzindo a temperatura de indução para 30°C. Ambas as construções para expressão em periplasma parecem produzir crotamina recombinante presente na fração do precipitado do sonicado.

Utilizando o vetor pRSET-A Cro foi possível obter crotamina recombinante expressa no citoplasma. Após sonicação, a proteína recombinante foi detectada na fração insolúvel do lisado bacteriano. Verificamos migração anômala da crotamina em SDS-PAGE, provavelmente por associação com DNA bacteriano ou outras moléculas.

REFERÊNCIAS¹

ACACLONE, DNA Analyses software pDRAW32, [S.I]: AcaClone software, 2013.

ALLEN, H.R.; MERCHANT, M.L.; TUCKER, R.K.; FOX, J.W.; GEREN, C.R.; Characterization and chemical modification of E toxin isolated from timber rattlesnake (*Crotalus horridus horridus*) venom. **Journal of Natural Toxins**, v. 5, p. 409 – 427, 1996.

ALEXANDER, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA H.; SCHWARTZMAN R. J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, v. 26, n. 10, p. 953 – 960, 1988.

ARCANGELI, A.; BECCHETTI, A. New trends in cancer therapy: targeting ion channels and transporters. **Pharmaceutical**, v. 3, p. 1202 – 1225, 2010.

BAKKEN, G. S.; KROCHMAL, A.R. The imaging properties and sensitivity of the facial pits of pitvipers as determined by optical and heat-transfer analysis. **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 2801 – 2810, 2007.

BALDUINO, K. N.; SPENCER, P. J.; MALAVASI, N. V.; CHURA-CHAMBI, R. M.; LEMKE, L. S.; MORGANTI, L. Refolding by high pressure of a toxin containing seven disulfide bonds: bothropstoxin-1 from *Bothrops jararacussu*. **Molecular Biotechnology**, v. 48, n. 3, p. 228 – 234, 2011.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 411 – 421, 1999.

BARBOSA, M. D.; GREGH, S. L.; PASSANEZI, E. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. **Journal Periodontology**, v. 78, n. 10, p. 2026 – 2031, 2007.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informações e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BASSETTE, P. H.; ASLUND, F.; BECHWITH, J.; GEORGIUS, G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 24, p. 13703 – 13708, 1999.

BATEMAN, A.; WU, C.; XENARIOS, I. Uniprot: The Universal Protein Resource. Disponível em <<http://www.uniprot.org>>. Acesso em: 08 ago. 2013.

BEETON, C.; WULFF, H.; BARBARIA, J.; CLOT-FAYBESSE, O.; PENNINGTON, M.; BERNARD, D.; CAHALAN, M. D.; CHANDY, K. G.; BÉRAUD, E. Selective blockad of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 13942 – 13947, 2001.

BIEBER, A. L.; McPARLAND, R. H.; BECKER, R. R. Amino acid sequences of myotxin from *Crotalus viridis concolor* venom. **Toxicon**, v. 25, p. 677 – 680, 1987.

BIEBER, A.L.; NEDELKOV, D. Structural, biological and biochemical studies of myotoxin a and homologous myotoxin. **Journal of Toxicology -Toxin Review**, v. 16 p. 33 – 52, 1997.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; CORRÊA-NETTO, C.; SILVA, M. M. S.; RODRIGUES, R. S.; DE LA TORRE, P.; PÉREZ, A.; SOARES, A. M.; ZINGALI, R. B.; NOGUEIRA, R. A.; RODRIGUES, V. M.; SANZ L.; CALVETE, J. J. Snake venom and antivenom of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **Journal of Proteomics**, v. 73, p. 17758 – 1776, 2010.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Venoms, venomics, antivenomics. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 583, p. 1736 – 1743, 2009.

CASEWELL, N. R.; HUTTLEY, G. A.; WÜSTER, W. Dynamic evolution of venom proteins in squamate reptiles. **Nature Communications**, v. 3, n. 1066, p. 1 – 10, 2012.

CASEWELL, N. R.; WÜSTER, W.; VONK, F. J.; HARRISON, R. A.; FRY, B. G. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 28, n. 4, p. 219 – 229, 2013.

CASTOE, T. A.; PARKINSON, C. L. Bayesian mixed models and the phylogeny of pitvipers (Viperidae: Serpentes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 39, n. 1, p. 91 – 110, 2006.

CHANG, C. C.; TSENG, K. H. Effect of crotamine, a toxin of south American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 63, p. 551 – 559, 1978.

CHEN, P. C.; HAYASHI, M. A. F.; OLIVEIRA, E. B.; KARPEL, R. L. DNA-Interactive Properties of Crotamine, a Cell-Penetrating Polypeptide and a Potential Drug Carrier. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1 – 11, 2012.

CHEN, Y. C.; CHEN, L. A.; CHEN, S. J.; CHANG, M. C.; CHEN, T. L. A modified osmotic shock for periplasmic release of a recombinant creatinase from *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, p. 211 – 215, 2004.

CHOI, J. H.; LEE, S. Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 64, p. 625 – 635, 2004.

CHURA-CHAMBI, R. M.; GENOVA, L. A.; AFFONSO, R.; MORGANTI, L. Refolding of endostatin from inclusion bodies using high hydrostatic pressure. **Analytical Biochemistry**, v. 379, n. 1, p. 32 – 39, 2008.

CLUSTAL OMEGA, SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D. G.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; McWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Clustal Omega Alignments, versão 1.2.2. Science Foundation Ireland. Software, 2016.

CORIN, R. E.; VISKATIS, L. J.; VIDAL, J. C.; ETCHEVERRY, M. A. Cytotoxicity of crotoxin on murine erythroleukemia cells *in vitro*. **Investigational New drugs**, v. 11, n. 1, p. 11 – 15, 1993.

CORNELIS, P. Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. **Current Opinions in Biotechnology**, v. 11, p. 450 – 454, 2000.

CORONADO, M. A.; GABDULKHAKOV, A.; GEORGIEVA, D.; SANKARAN, B.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K.; BETZEL, C. Structure of the polypeptide crotoamine from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Biological Crystallography**, v. 69, p. 1958 – 1964, 2013.

COSTA, B. A.; SANCHES, L.; GOMIDE, A. B.; BIZERRA, F.; DAL MAS, C.; OLIVEIRA, E. B.; PEREZ, K. G.; ITRI, R.; OGUIURA, N.; HAYASHI, M. A. F. Interaction of the rattlesnake toxin crotoamine with model membrane. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 118, p. 5471 – 5479, 2014.

CUSHMAN, D. W.; ONDETTI, M. A. History of the design of Captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Personal and Historical Perspectives**, v. 17, n. 4, p. 589 – 592, 1991.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 297 – 306, 2009.

DHOPLE, V.; KRUKEMEYER, A.; RAMAMOORTHY, A. The human beta defensin-3, a antimicrobial peptide with multiple biological functions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1758, p. 1499 – 1512, 2006.

ESCOUBAS, P.; KING, G. F. Venomics as a drug discovery platform. **Expert Review Proteomics**, v. 6, n. 3, p. 221 – 224, 2009.

FADEL, V.; BETTENDORFF, P.; HERMAN, T.; AZEVEDO, W. F. Jr.; OLIVEIRA, E. B.; YAMANE, T.; WÜTHRICH, K. Automated NMR structure determination and disulfide bond identification of the myotoxin crotoamine from *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 46, p. 759 – 767, 2005.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 200 – 209, 2009.

FRY, B. G. From genome to “venome”: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. **Genome Research**, v. 15, p. 403 – 420, 2005.

FRY, B. G.; CASEWELL, N. R.; WÜSTER, W.; VIDAL, N.; YOUNG, B. The structural and functional diversification of the Toxicofera reptile venom system. **Toxicon**, v. 60, p. 434 – 448, 2012.

FRY, B. G.; ROELANTS, K.; CHAMPAGNE, D. E.; SCHEIB, H.; TYNDALL, J. D. A.; NEVALAINEN, T. J.; NORMAN, J. A.; LEWIS, R. J.; NORTON, R. S.; RENJIFO, C.; RODRÍGUEZ de la VEGA, R. C. The toxicogenome multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. **The Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 10, p. 483 – 511, 2009.

FRY, B. G.; SCHEIB, H.; VAN DE WEERD, L.; YOUNG, B.; McNAUGHTAN, J.; RAMJAN, S. F. R.; VIDAL, N.; POELMANN, R. E.; NORMAN, J. A. Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). **Molecular and Cellular Proteomics**, p. 215 – 246, 2008.

FRY, B. G.; WINKEL, K. D.; WICKRAMARATNA, J. C.; HODGSON, W. C.; WÜSTER, W. Effectiveness of snake antivenom: Species and regional venom variation and its clinical impact. **Journal of Toxicology**, v. 22, n. 1, p. 23 – 34, 2003.

FUTAKI, S.; SUZUKI, T.; OHASHI, W.; YAGAMI, T.; TANAKA, S.; UEDA, K.; SUGIURA, Y. Arginine-rich peptides – an abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carrier for intracellular protein delivery. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 8, p. 5836 – 5840, 2001.

GARCIA-FRUITÓS, E. Inclusion bodies: a new concept. **Microbial Cell Factories**, v.9, n. 80, p. 1 – 3, 2010.

GASCUEL O, DANCHIN A. Protein export in prokaryotes and eukaryotes: indications of a difference in the mechanism of exportation. **Journal of Molecular Evolution**, v. 24, n. 1-2, p. 130 – 142, 1986.

GEORGIEVA, D.; ÖHLER, M.; SEIFERT, J.; VON BERGEN, M.; ARNI, K.; GENOV, N.; BETZEL, C. Snake venom of *Crotalus durissus terrificus* – correlation with pharmacological activities. **Journal of Proteome**, v. 30, n. 20, p. A-O, 2009.

GONÇALVES, J. M., POLSON, A. The electrophoretic analysis of snake venoms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 13, p. 253–259, 1947.

GONÇALVES, J. M.; VIEIRA, L. G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. I. Análise eletroforética, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 22, 1950.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; HAWGOOD, B. Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular injection, **Toxicon**, v. 22, n. 5, p. 791 – 804, 1984.

GRUBER, A.; ZINGALES, B. Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. **Biotechniques**, v. 19, n. 1, p. 28 – 30, 1995.

HARVEY, A. L. Toxin and drug discovery. **Toxicon**, v. 92, p. 193 – 200, 2014.

HATAHET, F.; BOYD, D.; BECKWITH, J. Disulfide bound formation in prokaryotes: history, diversity and design. **Biochim Biophys Acta**, v. 1844, n. 8, p. 1402 – 1414, 2014.

HAYASHI, M. A.; NASCIMENTO F. D.; KERKIS, A.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA E. B.; PEREIRA, A.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; NADER H. B.; YAMANE, T.; KERKIS, I.; TERSARIOL, I. L. Cytotoxic effect of crotoxin are mediated through lysosomal membrane permeabilization. **Toxicon**, v. 52, n. 3, p. 508 – 517, 2008.

HAYES, W. K. Venom metering by juvenile prairie rattlesnake, *Crotalus v. viridis*: effects of prey size and experience. **Animal Behaviour**, v. 50, p. 33 – 40, 1995.

HAZLETT, L.; WU, M. Defensins in innate immunity. **Cell Tissue Research**, v. 343, p. 175 – 188, 2011.

HOSER, R. A reclassification of the rattlesnakes; species formerly exclusively referred to the genera *Crotalus* and *Sistrurus*. **Australasian Journal of Herpetology**, v. 6, p. 1 – 21, 2009.

HUMPHREYS DP, SEHDEV M, CHAPMAN AP, GANESH R, SMITH BJ, KING LM, GLOVER DJ, REEKS DG, STEPHENS PE. High-level periplasmic expression in *Escherichia coli* using a eukaryotic signal peptide: importance of codon usage at the 5' end of the coding sequence. **Protein Expression and Purification**, v. 20, n. 2, p. 252 – 264, 2000.

JACKSON, K. The evolution of venom-delivery systems in snakes. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 137, p. 337 – 354, 2003.

JACSON, K. The evolution of venom-conducting fangs: insights from developmental biology. **Toxicon**, v. 49, p. 975 – 981, 2007.

JAIN, D.; KUMAR, S. Snake venom: a potent anticancer agent. **Asian Pacific journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 4855 – 4860, 2012.

JANA, S.; DEB, J. K. Strategies for efficient production of heterologous protein in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 289 – 298, 2005.

JANDROT-PERRUS, M.; LARGUE, A. H.; LEDUC, M.; OKUMA, M.; BON, C. Convulxin-induced platelet adhesion and aggregation: involvement of glycoproteins VI and Ila. **Platelets**, v. 9, p. 207 – 211, 1998.

JHA, D.; MISHRA, R.; GOTTSCHALK, S.; WIESMÜLLER, K. H.; UGURBIL, K.; MAIER, M. E.; ENGELMANN, J. CyLoP-1: a novel cysteine-rich cell-penetrating peptides for cytosolic delivery of cargoes. **Bioconjugate Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 319 – 328, 2011.

KATO, K.; FURIHATA, K.; CHELI, Y.; RADIS-BAPTISTA, G.; KUNICKI, T. J. Effect of multimer size and a natural dimorphism on the binding of convulxin to platelet glycoprotein (GP)VI. **Journal Thrombosis Haemostasis**, v. 4, n. 5, p. 1107 – 1113, 2006.

KERKIS, I.; HAYASHI, M. A. F.; PRIETO DA SILVA, A. R. B.; PEREIRA, A.; DE SÁ JUNIOR, P. L.; ZAHARENKO, A. J.; RADIS-BAPTISTA, G.; KERKIS, A.; YAMANE, T. State of the art in the studies on crotalesin, a cell penetrating peptide from South America rattlesnake. **Biomedical Research International**, p. 1 – 9, 2014.

KERKIS, A.; HAYASHI, M. A. F.; YAMANE, T.; KERKIS, I. Properties of cell penetrating peptides (CPPs). **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 58, n. 1, p. 7 – 13, 2006.

KERKIS, A.; KERKIS, I.; RADIS-BAPTISTA, G.; OLIVEIRA, E. B.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; PEREIRA, L. V.; YAMANE, T. Crostamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 18, p.1407 – 1409, 2004.

KERKIS, I.; SILVA, F. S.; PEREIRA, A.; KERKIS, A.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Biological versatility of crostamine - a cationic peptide from the venom of a South American rattlesnake. **Expert Opinion Investigational Drugs**, v. 19, n. 12, p. 1515 – 1525, 2010.

KHAN, K. H. Gene expression in mammalian cells and its applications. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 3, n. 2, p. 257 – 263, 2013.

KHOW, O.; SUNTRARACHUN, S. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. 159 – 162, 2012.

KING, G. F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 11, n. 11, p. 1469 – 1484, 2011.

KNOP, F. K.; BRONDEN, A.; VILSBOL, T. Exenatide: pharmacokinetics, clinical use, and future directions. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, 2017.

KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, v. 25, n. 1, p. 65 – 106, 1987.

KOPITO, R. R. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. **Cell Biology**, v. 10, p. 524 – 530, 2000.

KORDIS, D.; GUBENSEK, F. Adaptive evolution of animal toxin multigene families. **Gene**, v. 261, p. 43 – 52, 2000.

KOSINSKI, M. J.; BAILEY, J. E. Temperature and induction effects on the degradation rate of an abnormal β -galactosidase in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 55 – 68, 1991.

KROCHMAL, A. R.; BAKKEN, G. S. Thermoregulation is the pits: use of thermal radiation for retreat site selection by rattlesnake. **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 2539 – 2545, 2003.

LAURE, C. J. The primary structure of crotamine. **HoppeSeylers Zeitschrift fur Physiologische Chemie**, v. 356, n. 2, p. 313 - 315, 1975.

LEDUC, M.; BOM, C. Cloning of subunits of convulxin, a collagen-like platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochemical Journal**, v. 15, n. 333, p. 389 – 393, 1998.

LEE, C. D.; SUN, H. C.; HU, S.; CHIU, C. F.; HOMHUAN, A.; LIANG, S. M.; LENG, C. H.; WANG, T. F. An improved SUMO fusion protein system for effective production of native proteins. **Protein Science**, v. 17, n. 7, p. 1241 – 1248, 2008.

LEE, K. J.; KIM, Y. K.; KRUPA, M.; NGUYEN, A. N.; DO, B. H.; CHUNG, B.; VU, T. T.; KIM, S. C.; CHOE, H. Crotamine stimulates phagocytic activity by inducing nitric oxide and TNF- α via p38 and NF κ -B signaling in RAW 264.7 macrophages. **Biochemistry and Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 3, p. 185 – 190, 2016.

LEMKE, L. S.; CHURA-CHAMBI, R. M.; RODRIGUES, D.; CUSSIOL, J. R.; MALAVASI, N. V.; ALEGRIA, T. G.; NETTO, L. E.; MORGANTI, L. Investigation on solubilization protocols in the refolding of the thioredoxin TsnC from *Xylella fastidiosa* by high hydrostatic pressure approach. **Protein Expression Purification**, v. 106, p. 72 – 77, 2015.

LOW, K. O.; MUHAMMAD MAHADI, N. M. D.; ILLIAS R. Optimization of signal peptide for recombinant protein secretion in bacterial hosts. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, n. 9, p. 3811 – 3826, 2013.

MAEDA, N.; TAMYA, N.; PATTABHIRAMAN, T. R.; RUSSEL, F. E. Some chemical properties of the venom of the rattlesnake, *Crotalus viridis helleri*. **Toxicon**, v. 16, p. 431 – 441, 1978.

MARKIDES, S. C. Strategies for achieving high-level in *Escherichia coli*. **Microbiological Review**, v. 60, n. 3, p. 512 – 538, 1996

MARTSON, F. A. O. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized *Escherichia coli*. **Biochemistry Journal**, v. 240, p. 1 – 12, 1986.

McCUE, M. D. Cost of producing venom in three North American pitvipers species. **Copeia**, v. 4, p. 818 – 825, 2006.

MILJANICH, G. P. Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. **Current Medical Chemistry**, v. 11, p. 3029 – 3040, 2004.

NASCIMENTO, F. D.; HAYASHI, M. A. F.; KERKIS, A.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, E. B.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; NADER, H. B.; YAMANE, T.; TERSARIOL, I. L. S.; KERKIS, I. Crota mine mediates gene delivery into cell through the binding to heparin sulfate proteoglycan. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 29, p. 21349 – 21360, 2007.

NASCIMENTO, F. D.; SANCEY, L.; PEREIRA, A.; ROME, C.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, E. B.; NADER, H. B.; YAMANE, T.; KERKIS, I.; TERSARIOL, I. L. S.; COLL, J. L.; HAYASHI, M. A. The natural cell-penetrating peptide crota mine targets tumor tissue *in vivo* and triggers a lethal calcium-dependent pathway in cultured cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 2, p. 211 – 221, 2012.

NEI, M.; GU, X.; SITNIKOVA, T. Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 7799 – 7806, 1997.

NICASTRO, G.; FRANZONI, L.; CHIARA, C.; MANCIN, A. C.; GIGLIO, J. R.; SPISNI, A. Solution structure of crota mine, a Na⁺ channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 1969 – 1979, 2003.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; AFFONSO, R.; ZHANG, G. *In vitro* antibacterial and hemolytic activities of crota mine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. **Journal of Antibiotics**, v. 64, n. 4, p. 327 – 331, 2011.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crota mine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon**, v. 46, p. 363 – 370, 2005.

OGUIURA, N.; COLLARES, M. A.; FURTADO, M. F. D.; FERRAREZI, H.; SUZUKI, H. Intraspecific variation of crotamine and crotasin genes in *Crotalus durissus terrificus*. **Gene**, v. 446, p. 35 – 40, 2009.

OSTERMEIER, M; GEORGIUS, G. The folding of bovine pancreatic trypsin inhibitor in the *Escherichia coli* periplasm. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 33, p. 21072 – 21077, 1994.

OWNBY, C. L.; CAMERON, M. S.; TU, A. T. Isolation of myotoxin component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. **Americal Journal of Pathology**, v. 85, p. 149 – 166, 1976.

PARDO, L. A. Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. **Physiology**, v. 19, p. 285 - 292, 2004.

PARKINSON, C. L. Molecular systematics and biogeographical history of pitvipers as determined by mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Copeia**, v. 3, p. 576 – 586, 1999.

PEIGNEUR, S.; ORTS, D. J. B.; PRIETO DA SILVA, A. R. B.; OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; OLIVEIRA, E. B.; ZAHARENKO, A. J.; DE FREITAS, J. C.; TYTGAT, J. Crotamine pharmacology revisited: novel insights based on the inhibition of KV channels. **Molecular Pharmacology**, v. 82, n.1, p. 90 – 96, 2012.

PEREIRA, A.; KERKIS, A.; HAYASHI, M. A. F.; PEREIRA, A. S. P.; SILVA, F. S.; OLIVEIRA, E. B.; PRIETO DA SILVA, A. R. B.; YAMANE, T.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; KERKIS, I. Specific antineoplastic activity of crotamine, a cationic antimicrobial and cell penetrating peptide from the venom South American rattlesnake, against tumorigenic cells. **Expert Opinion Investigation Drugs**, v.20, n. 9, 2011.

PETERNEL, S.; GRDADOLNIK, J.; GABERC-POREKAR, V.; KOMEL R. Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 34, p. 1 – 9, 2008.

PETI, W.; PAGE, R. Strategie to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. **Protein Expression and Purification**, v. 51, p. 1 – 10, 2007.

PINES O, INOUE M. Expression and secretion of proteins in *E. coli*. **Molecular Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 25 – 34, 1999.

PRIETO DA SILVA, A. R. B.; FRY, B. G.; SUNAGAR, K.; SCHEIB, H.; JACKSON, T. N. W.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; ZAHARENKO, A. J.; DE SÁ Jr, P. L.; PEREIRA, A.; OGUIURA, N.; HAYASHI, M. A. F.; KERKIS, A.; YAMANE, T.; KERKIS, I. Beta-Defensins. In: FRY, B. G. **Venomous reptiles e their toxins: Evolution, pathophysiology e biodiscovery**. New York: Oxford University Press, 2015. Cap. 9, p. 228 – 238.

PUSHPANATHAN, M.; GUNASEKARAN, P.; RAJENDHARAN, J. Antimicrobial peptides: versatile biological properties. **International Journal of Peptides**, v. 2013, p. 1 – 15, 2013

QIU, J.; SWARTZ, J. R.; GEORGIUS, G. Expression of active human tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. **Applied and Enviroment Microbiology**, p. 4891 – 4896, 1998.

QUIJADA-MASCARENHAS, A.; WÜSTER, W. On the origins and dispersal of Neotropical rattlesnake in South America. **CAH/ACH Bulletin**, v. 14, p. 6 – 12, 2006.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; DE LA TORRE, B. G.; ANDREU, D. Insights into the uptake mechanism of NrTPs, a cell-penetrating peptide preferentially targetiong the nucleolus of tumor cell. **Chemical Biology Drug Design**, v. 79, n. 6, p. 907 – 916, 2012.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; KUBO, T.; OGUIURA, N.; PRIETO DA SILVA, A. R. B.; HAYASHI, M. A. F.; OLIVEIRA, E. B.; YAMANE, T. Identification of crotoxin, a crotoxin related gene of *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 43, p. 751 – 759, 2004.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; KUBO, T.; OGUIURA, N.; SVARTMAN, M.; ALMEIDA, T. M. B.; BATISTIC, R. F.; OLIVEIRA, E. B.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; YAMANE, T. Structural and chromosomal localization of the gene for crotoxin, a toxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrrificus*. **Toxicon**, v. 42, p. 747 – 752, 2003.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; KERKIS, I. Crotonamine, a small basic polypeptide myotoxin from rattlesnake venom with cell-penetrating properties. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 38, p. 4351 – 4361, 2011.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; KERKIS, A.; PRIETO-DA-SILVA, A. R. B.; HAYASHI, M. A. F.; KERKIS, I.; YAMANE, T. Membrane-translocating peptides and toxins: from nature to bedside. **The Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 2, p. 211 – 225, 2008.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; OGUIURA, N.; HAYASHI, M. A. F.; CAMARGO, M.E.; GREGO, K.F.; OLIVEIRA, E.B.; YAMANE, T. Nucleotide sequence of crotonamine isoform precursors from a single South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 37, p. 973 – 984, 1999.

RAMANAN, R. N.; TAN, J. S.; MOHAMED, M. S.; LING, T. C.; TEY, B. T.; ARIFF, A. B. Optimization of osmotic shock process variable for enhancement of the release of periplasmic interferon- α 2b from *Escherichia coli* using response surface method. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 196 – 202, 2010.

RAMÓN, A.; SEÑORALE-POSE, M.; MARÍN, M. Inclusion bodies: not that bad. **Frontier in microbiology**, v. 5, p. 1 – 6, 2014.

REID, P. F. Toxin as therapeutic agents alpha-cobratoxin as a possible therapy for multiple sclerosis: a review of the literature leading to its development this application. **Critical Reviews in Immunology**, v. 27, n. 4, p. 291 – 302, 2007.

RIZZI, C.T.; CARVALHO-DE-SOUZA, J. L.; SCHIAVON, E.; CASSOLA, A.C.; WANKE, E.; TRONCONE, L. R. P. Crotonamine inhibits preferentially fast-twitching muscle but is inactive on sodium channels. **Toxicon**, v. 50, p. 553 – 562, 2007.

RODRIGUES, M.; ANDREU, D.; SANTOS, N. C. Uptake and cellular distribution of nucleolar targeting peptides (NrTPs) in different cells types. **Biopolymers**, v. 104, n. 2, p. 101 – 109, 2015.

RODRIGUES, M.; DE LA TORRE, B. G.; ANDREU, D.; SANTOS, N. C. Kinetic uptake profiles of cells penetrating peptides in lymphocytes and monocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 10, p. 4554 – 4563, 2013

RODRIGUES, M.; DE LA TORRE, B. G.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; SANTOS, N. C.; ANDREU, D. Efficient cellular delivery of β -galactosidase mediated by NrTPs, a new family of cell penetrating peptides. **Bioconjugate Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 2239 – 2244, 2011.

ROSANO, G. L.; CICCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1 -17, 2014.

RUDOLPHI, R.; LILIE, H. *In vitro* folding of inclusion body proteins. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 10, p. 40 – 56, 1996.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic protein through bacterial expression system: a review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 308, p. 249 – 264, 2008.

SAMEJIMA, Y.; AOKI, Y.; MEBS, D. Amino acid sequence of a myotoxin from venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **Toxicon**, v. 29, n. 4, p. 461 – 468, 1987.

SANCHEZ-GRACIA, L.; MARTÍN, L.; MANGUES, R.; FERRE-MIRALLES, N.; VÁSQUEZ, E.; VILLAVERDE, A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. **Microbial Cells Factories**, v.15, n. 33, p. 1 -7, 2016.

SANTOS, MC.; MORHY, L.; FERREIRA, L.C.L.; OLIVEIRA, E. B. Purification and properties of a crotoamine analog from *Crotalus durissus ruruima* venom. **Toxicon**, v. 31, p. 166, 1993.

SCHENBERG, S. Geographical pattern of crotoamine distribution in the same rattlesnake subspecies. **Science**, v. 129, p. 1361 – 1363, 1959.

SEKI, C., VIDAL, J. C., BARRIO, A. Purification of gyroxin from a south American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. **Toxicon**, v. 18, p. 235 – 247, 1980

SILVEIRA DE OLIVEIRA, J. S.; PRIETO DA SILVA, A. R. B.; SOARES, M. B.; STEPHANO, M. A.; DIAS, W. D.; RAW, I.; HO, P. L. Cloning and characterization of an alpha-neurotoxin-type protein specific for the coral snake *Micrurus corallinus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 267, n. 3, p. 887-891, 2000.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 303 – 310, 2005.

SIQUEIRA, A. M.; MARTINS, N. F.; DE LIMA, M. E.; DINIZ, C. R.; CARTIER, A.; BROWN, D.; MAIGRET, B. A. Proposed 3D structure for crodamine based on homology building, molecular simulations and circular dichroism. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, p. 389 – 398, 2002.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. 1, p. 1 – 8, 2005.

STRAIGHT, R. C.; GLENN, J. L.; WOLT, T. B.; WOLFE, M. C. Regional differences in content of small basic peptide toxin in the venom of *Crotalus adamanteus* and *Crotalus horridus*. **Comparative Biochemistry. Physiology**, v. 100, p. 51 – 58, 1991.

STUDIER, F. W.; ROSENBERG, A. H.; DUNN, J. J.; DUBENDORF, J. W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods in Enzymology**, v. 185, p. 60 – 89, 1990.

SWARTZ, J. R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 195 – 201, 2001.

TAYLOR, K.; BARRAN, P. E.; DORIN, J. R. Structure activity relationships in β -defensin peptides. **Peptide Science**, v. 90, n. 1, p. 1 – 7, 2007.

TERPE, K. Overview of bacterial expression system for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamental to commercial system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 211 – 222, 2006.

THANARAJ, T.A.; ARGOS, P. Protein secundar structural types are differetially coded on messenger RNA. **Protein Science**, v. 5, p. 1973 – 1983, 1996.

UETZ, P. The Reptile database, 1996. Disponível em <<http://www.reptile-database.org>>. Acessado em: 12 set. 2016.

UTKIN, Y. N. Animal venom studies: current benefits and future development. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 28 – 33, 2015.

VONK, F. J.; ADMIRAAL, J. F.; JACKSON, K.; RESHEF, R.; BAKKER, M. A. G.; VANDERSCHOOT, K.; VAN DE BERGE, I.; VAN ATTEN, M.; BURGERHOUT, E.; BECK A.; MIRTSCHIN, P. J.; KOCHVA. E.; WITTE, F.; FRY, B. G.; WOODS, A. E.; RICHARDSON, M. K. Evolutionary origin and development of snake fangs. **Nature**, v. 454, p. 630 – 633, 2008.

VU, T. T. T.; JEONG, B.; YU, J.; KOO, B. K.; JO, S. H.; ROBINSON, C. R.; CHOE, H. Soluble prokaryotic expression and purification of crotoxin using an N-terminal maltose-binding protein tag. **Toxicon**, v. 92, p. 157 – 165, 2014.

VYAS, V. K.; BRAHMBHATT, K.; BHATT, H.; PARMAR, U. Therapeutic potencial of snake venom in cancertherapy: current perspectives. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n.2, p. 156 – 162, 2013

WULFF H, PENNINGTON M. Targeting effector memory T-cells with Kv1.3 blockers. **Current Opinion Drug Discovery Development**, v. 10, n. 4, p. 438 – 445, 2007.

WÜSTER, W.; BÉRNILS, R. S. On the generic classification of the rattlesnakes, with special reference to the Neotropical *Crotalus durissus* complex (Squamata: Viperidae). **Sociedade Brasileira de Zoologia**, v. 28, n. 4, p. 417 – 419, 2011.

WÜSTER, W.; FERGUSON, J. E.; QUIJADA-MASCARENHAS, J. A.; POOK, C. E.; SALOMÃO, M. G.; THORPE, R. S. Tracing na invasion: landbridges, refugia and phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). **Molecular Ecology**, v. 14, p. 1095 – 1108, 2005.

WÜSTER, W.; PEPPIN, L.; POOK, C. E.; WALKER, D. E. A nesting of vipers: Phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p. 445 – 459, 2008.

XIONG, S.; WANG, Y. F.; REN, X. R.; LI, B.; ZHANG, M. Y.; LUO, Y.; ZHANG, L.; XIE, Q. L.; SU, K. Y. Solubility of disulfide bonded proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* and its “oxidizing” mutant. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 7, p. 1077 – 1082, 2005.

YAMANE, E. S.; BIZERRA, F. C.; OLIVEIRA, E. B.; MOREIRA, J. T.; RAJABI, M.; NUNES, G. L. C.; DE SOUZA, A. O.; DA SILVA, I. D. C. G.; YAMANE, T.; KARPEL, R. L.; JUNIOR, P. I. S.; HAYASHI, M. A. F. Unraveling the antifungal activity of a South American rattlesnake toxin crodamine. **Biochimie**, v. 95, p. 231 – 240, 2013.

FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO – FAPESP, São Paulo – SP, YAMANE, T.; KERKIS, I.; KERKIS, A.; BAPTISTA, G. R.; HAYASHI, M. A. F.; KONNO, K.; DA SILVA, A. R. B.; PEREIRA, L. D. V.; DE OLIVEIRA, E. B.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; FURUIE HAYASHI, M. A.; DA SILVA, A. R. B. P.; DA VEIGA PEREIRA, L.; BRANDT DE OLIVEIRA, E. Use of crodamine for transporting molecules such as nucleic acids to the surfasse, cytoplasm or nucleous of the cell, or for preparing a composition for treating deseases or dysfunction linked to cell proliferation: **Use of crodamine, Kit and composition**: WO2006096953, 21 set. 2006.

YOUNT, N. Y.; KUPFERWASSER, D.; SPISNI, A; DUTZ, S. M; RAMJAN, Z. H; SHARMA, S; WARING, A. J; YEMAN, M. R. Selective reciprocity in antimicrobial activity versus cytotoxicity of hBD- 2 and crodamine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,v. 106, n. 35, p. 14972 – 14977, 2009.

YUNUS, A. A.; LIMA, C. D. Purification of SUMO conjugating enzymes and kinetic analysis of substrate conjugation. **Methods in Molecular Biology** v.497, p. 167 – 186, 2009.

ZALUCKI, Y. M.; JENNINGS, M. P. Experimental confirmation of a key role for non-optimal codons in protein export. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,v. 30, n. 355, p. 143 – 148, 2007.

ZALUCKI, Y. M.; POWER, P. M.; JENNINGS, M. P. Selection for efficient translation initiation biases codon usage at a second amino acid position in secretory proteins. **Nuclein Acid Research**, v. 35, n. 17, p. 5748 – 5754, 2007.

ZALUCKI, Y. M.; BEACHAM, I. R.; JENNINGS, M. P. Coupling between codon usage, translation and protein export in *Escherichia coli*. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 6, p. 660 – 667, 2011.