

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**  
**ERNESTO LOPES PINHEIRO JUNIOR**

**Caracterização estrutural, funcional e análise da resposta imune *in vivo* de uma serinoprotease recombinante de *Crotalus durissus collilineatus* modificada por PEGilação**

Ribeirão Preto

2021

ERNESTO LOPES PINHEIRO JÚNIOR

**Caracterização estrutural, funcional e análise da resposta imune *in vivo* de uma serinoprotease recombinante de *Crotalus durissus collilineatus* modificada por PEGilação**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

**Orientadora:** Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga

Versão corrigida da tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 09/02/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Ribeirão Preto

2021

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

Ernesto Lopes Pinheiro Júnior  
Caracterização estrutural, funcional e análise da resposta imune in vivo de uma serinoprotease recombinante de *Crotalus durissus collilineatus* modificada por PEGlação. Ribeirão Preto, 2020.

183 p. : il. ; 30cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes

1. *Crotalus durissus collilineatus*; 2. Serinoproteases de peçonhas de serpentes; 3. PEGlação de proteínas; 4. Expressão heteróloga de toxinas; 5. Caracterização estrutural; 6. Caracterização funcional; 7. Imunogenicidade.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Ernesto Lopes Pinheiro Júnior

Caracterização estrutural, funcional e análise da resposta imune in vivo de uma serinoprotease recombinante de *Crotalus durissus collilineatus* modificada por PEGlação.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

---

**DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais,  
*Elisa Helena Sertore e Ernesto Lopes Pinheiro,*  
pelo exemplo de garra, fibra e honestidade.  
Obrigado pelo suporte e todo o carinho.

---

**AGRADECIMENTOS**

Agradeço à vida e todas as forças superiores que a regem pelas oportunidades que me trouxeram até aqui. Sou grato pelas pessoas que encontrei no caminho, as quais tornaram essa jornada ainda mais prazerosa. Gratidão a todos os momentos: os bons, pelo prazer proporcionado, e aos desafios, os quais me fizeram crescer de todas as maneiras possíveis.

Aos meus pais, minha fonte de amor, meu alicerce, meus melhores exemplos, meu tudo. Mãe, pai, eu não tenho palavras para expressar a gratidão que sinto por vocês. Obrigado por acreditarem em mim. Obrigado pelos conselhos, desabafos, pelos “papos-cabeça” na mesa do jantar e por fazerem o possível e o impossível para que eu chegasse até aqui. O suporte de vocês foi e sempre será fundamental para mim. Amo vocês. Incondicionalmente.

À Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga, minha orientadora-mãe. ‘Chefa’, sou eternamente grato pelo ‘sim’ naquele fevereiro de 2010, quando a senhora abriu as portas do seu laboratório para mim, até então apenas um aluno de graduação. Obrigado pelo aprendizado, amizade, puxões de orelha e as oportunidades que eu tive ao longo desta jornada. A senhora foi e sempre será uma mãe, amiga, um exemplo de profissional a ser seguido. Tenho um carinho muito, mas muito grande por você!

À Johara Boldrini França que, antes de ser minha coorientadora, é, acima de tudo, uma das minhas melhores amigas. Jo, obrigado pela amizade, companheirismo e por toda a ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho. A biologia molecular não teria a mínima graça sem você por perto. Aprendi a amar ainda mais a pesquisa ao ver a sua dedicação por ela. Obrigado pela oportunidade de poder continuar essa história linda da collineina!

Ao Lucas Barros Bianchini. Obrigado pelo suporte, pela paciência, e por sempre acreditar no meu melhor. Obrigado por olhar toda a parte escrita desta tese, desde o início do seu desenvolvimento, e ouvir atentamente a todas as minhas apresentações, mesmo sem entender nada. Obrigado por me livrar do estresse e me acalmar nos momentos mais difíceis. Seu companheirismo é algo precioso para mim.

Ao eterno ‘clã’: Renata, Francielle, Fernando, Johara e Fernanda. Nossa amizade foi e vai além dos limites de qualquer laboratório, cidade, estado ou país. Nossas conversas, desabafos, troca de ideias, artigos e experimentos foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional. Além disso, nossos momentos

juntos são parte do meu alicerce para levar essa vida adiante. Amo muito vocês e espero ter vocês sempre comigo!

Aos meus grandes amigos: Mariana, Marcelo, Hudson e Natália. Não tenho palavras para dizer a importância de vocês na minha vida! Marcelo, um obrigado especial pela ajuda no desenho das reações apresentadas nesta tese (além de me ouvir reclamar quase que diariamente sobre problemas banais). Agradeço a Deus todos os dias por ter ao meu redor pessoas tão maravilhosas para chamar de amigos. Amo cada um de vocês!

À Camila Takeno Cologna, por me mostrar que a vida na Bélgica é possível, apesar do frio e da distância. Cams, obrigado por todas as cervejas, risadas, conselhos e momentos compartilhados. Ter você por perto faz a vida na Bélgica mais agradável.

À Karla e Iara, as melhores técnicas e amigas que alguém pode pensar em ter. Meninas, muito obrigado por todo o suporte, profissional e emocional. Vocês são demais!

Às colegas do Laboratório de Toxinas Animais, Gisele, Isadora e Isabela, pelo dia a dia no LTA e pelos momentos compartilhados. Obrigado pelos desabafos e pelas várias risadas que dividimos ao longo desses anos. Obrigado por tornarem os dias mais leves e a rotina mais agradável.

To Jan Tytgat, for giving me the opportunity to spend those 17 months in his lab to perform key experiments during my sandwich PhD. Thank you for all the talks, knowledge, opportunities, and all the help throughout my journey in Belgium. The period I spent there was crucial for my professional and personal growth. I admire you a lot!

To Steve and Ana Peigneur, for the friendship, beers and for housing me during my first period in Belgium. Thanks, Steve, for teaching me basically everything I know about electrophysiology and the life in Belgium. One of the reasons why Leuven truly became a 'home' to me was all the support I got from you in all those moments. Thank you!

To Anne-Sophie, Diletta and Louise. Girls, 'dank je wel' for all the moments we spent and continue to spend together. I will never forget the day you said: "Yeah, things fall apart sometimes, but the good thing is that we have each other to lean on". In fact, I don't know what

it would have been without you two there. Thanks for the friendship and all the support, the work-related and the 'mental' one... You're really important to me and I hope we can still be in touch for many and many years.

To all my colleagues at the Toxicology and Pharmacology lab, Annie, Andrea, Hans, Jéssica, Big, Arne, Inès, Chris, Lieze and Michiel. Thanks for the support, lunches and all the good moments!

À Rosemary Ioshimine Gerolineto, pela paciência com as minhas crises de ansiedade e por toda a ajuda envolvendo a papelada e a burocracia destes últimos cinco anos. Obrigado pelas conversas e todo o apoio de sempre. O nosso programa de pós-graduação tem muita sorte em ter você por perto!

Ao Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes, Profa. Sra. Suely Vilela, Dra. Agnes Alessandra Sekijima Takeda e Dra. Tássia Rafaella Costa, pela colaboração na parte de caracterização estrutural e funcional deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, pelo apoio financeiro e estrutural, fundamentais para o desenvolvimento deste projeto e para disseminação, em congressos nacionais e internacionais, do conhecimento gerado durante estes anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, proc. nº 2016/04761-4), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, código de financiamento 001, proc. nº 88881.186830/2018-01) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, proc. nº 170702/2017-0), pelo suporte financeiro, essencial para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À toda a minha família, por dividir momentos maravilhosos comigo, tornando a vida mais leve. Vocês fazem Rio Preto ser uma cidade que eu sempre quero visitar!

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Be of good cheer. Do not think of today's failures, but of the success that may come tomorrow. You have set yourself a difficult task, but you will succeed if you persevere; and you will find a joy in overcoming obstacles.”*

Helen Keller

## RESUMO

PINHEIRO-JÚNIOR, E. L. **Caracterização estrutural, funcional e análise da resposta imune in vivo de uma serinoprotease recombinante de *Crotalus durissus collilineatus* modificada por PEGlação.** 2020. 183 p. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

As serinoproteases de peçonhas de serpentes (SVSPs) são enzimas capazes de afetar o sistema hemostático humano, dada sua semelhança com enzimas presentes em suas diferentes vias. Assim, são consideradas promissoras agentes terapêuticos, além de potenciais ferramentas biotecnológicas. A PEGlação, processo no qual há a conjugação de polietilenoglicol (PEG) às proteínas, busca reduzir a imunogenicidade e aumentar a drogabilidade destas biomoléculas *in vivo*. Neste contexto, este trabalho objetivou a purificação de uma SVSP (collineína-1) da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*, bem como a expressão da sua forma recombinante (rCollineína-1) na levedura *Pichia pastoris*. Ambas as proteínas foram PEGladas (PEG-collineína-1 e PEG-rCollineína-1) e as características estruturais e funcionais, além da avaliação da resposta imune, foram comparadas entre as quatro formas da enzima. A collineína-1 foi isolada da peçonha bruta através de dois passos cromatográficos em fase reversa, enquanto a rCollineína-1 foi purificada em três passos, em colunas de afinidade a íons metálicos imobilizados (IMAC) e troca catiônica. Em seguida, obteve-se uma população mono-PEGlada das proteínas. O modelo teórico da collineína-1 foi obtido utilizando a ferramenta SWISS-MODEL, revelando que a proteína possui estrutura semelhante a outras SVSPs. A análise de estabilidade térmica indicou que todas as formas da proteína apresentam temperaturas de desnovelamento semelhantes. O pH 5,0 foi a condição com menor temperatura de desnovelamento, enquanto o pH 7,0 se caracteriza como a melhor condição para a estabilidade de todas as formas avaliadas da enzima. Foi observado um aumento significativo no tamanho das proteínas após a PEGlação (collineína-1:  $4,0 \pm 0,4$  nm, PEG-collineína-1:  $9,9 \pm 1,1$  nm, rCollineína-1:  $4,9 \pm 1,3$  nm; PEG-rCollineína-1:  $10,7 \pm 1,3$  nm). Por outro lado, não foram visualizadas mudanças expressivas no conteúdo de estruturas secundárias das enzimas. O conteúdo de alfa-hélices (7%, 5%, 2%, 15%), folhas beta (31%, 31%, 31%, 22%), giros (21%, 19%, 16%, 17%) e elementos sem conformação definida (41%, 45%, 51%, 46%) para a collineína-1, PEG-collineína-1, rCollineína-1 e PEG-rCollineína-1, respectivamente, evidenciam que a PEGlação não alterou de maneira significativa a conformação espacial das proteínas. A determinação dos parâmetros cinéticos apontou valores de  $K_m$  semelhantes entre suas diferentes formas (collineína-1:  $0,920 \pm 0,079$  mM; rCollineína-1:  $1,243 \pm 0,113$  mM; PEG-collineína-1:  $1,317 \pm 0,117$  mM e PEG-rCollineína-1:  $1,4 \pm 0,119$  mM). No entanto, a constante catalítica ( $k_{cat}$ ) e a constante de especificidade ( $k_{cat}/K_m$ ) foram ligeiramente diferentes. A rCollineína-1 apresentou valores mais elevados destes parâmetros ( $k_{cat} = 2,934 \pm 0,118$  s<sup>-1</sup> e  $k_{cat}/K_m = 2,4 \pm 0,115$  mM.s<sup>-1</sup>) quando comparados à collineína-1 ( $k_{cat} = 0,497 \pm 0,017$  s<sup>-1</sup> e  $k_{cat}/K_m = 0,5 \pm 0,048$  mM.s<sup>-1</sup>), PEG-collineína-1 ( $k_{cat} = 0,502 \pm 0,020$  s<sup>-1</sup> e  $k_{cat}/K_m = 0,4 \pm 0,068$  mM.s<sup>-1</sup>) e PEG-rCollineína-1 ( $k_{cat} = 1,286 \pm 0,050$  s<sup>-1</sup> e  $k_{cat}/K_m = 0,9 \pm 0,084$  mM.s<sup>-1</sup>). Estes resultados indicam que a PEGlação não foi prejudicial à atividade catalítica das formas nativa e recombinante, corroborando os resultados de degradação de fibrinogênio, os quais mostraram que todas as formas da enzima possuem atividade catalítica sobre esse substrato. Contudo, observou-se que a inibição do canal para potássio hEAG1 induzida pelas proteínas nativa e recombinante PEGladas foi significativamente menor que a inibição causada pelas enzimas não-PEGladas ( $45,5 \pm 13,4\%$  para  $8,2 \pm 4,7\%$  e  $50,3 \pm 6,0\%$  para  $5,7 \pm 3,7\%$ , respectivamente, a 5  $\mu$ M). Por outro lado, um aumento de atividade inibitória no hERG1 foi observado para a PEG-collineína-1 e PEG-rCollineína-1, com valores de  $IC_{50}$  de  $22,4 \pm 1,1$   $\mu$ M e de  $10,0 \pm 0,4$   $\mu$ M, respectivamente. Outras serinoproteases foram testadas em hEAG1 e os resíduos de aminoácidos essenciais para a atividade destas enzimas neste canal foram propostos. A ausência de citotoxicidade em células PBMC e a inexistência de imunogenicidade *in vivo* avaliada em camundongos das proteínas PEGladas são resultados importantes na busca de uma aplicabilidade terapêutica. De maneira geral, a PEGlação destas proteínas direcionou sua atividade para o controle da hemostasia, ampliando as perspectivas de serem empregadas como agentes defibrinogênicos em condições patológicas como acidente vascular cerebral, trombose e embolia pulmonar.

Palavras-chave: SVSPs, expressão heteróloga, imunogenicidade, aplicabilidade terapêutica.

## ABSTRACT

PINHEIRO-JÚNIOR, E. L. **Functional and structural characterization and immune response evaluation of a recombinant serine protease from *Crotalus durissus collilineatus* modified by PEGylation.** 2020. 183 p. PhD thesis. School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Snake venom serinoproteases (SVSPs) are enzymes capable of affecting the human hemostatic system, given their similarity with enzymes present in its different pathways. Thus, they are considered promising therapeutic agents, in addition to potential biotechnological tools. PEGylation, a process in which polyethylene glycol (PEG) is conjugated to proteins, aims to reduce the immunogenicity and to increase the drugability of these biomolecules *in vivo*. In this context, this work aimed the purification of an SVSP (collinein-1) from *Crotalus durissus collilineatus* venom, as well as the expression of its recombinant form (rCollinein-1) in *Pichia pastoris* system. Both proteins were PEGylated (PEG-collinein-1 and PEG-rCollinein-1) and the structural and functional characterization, in addition to the evaluation of the immune response, were compared between the four forms of the enzyme. Collinein-1 was isolated from the crude venom by two reversed-phase chromatographic steps, while rCollinein-1 was purified in three steps, in columns of affinity to immobilized metal ions (IMAC) and cation exchange. Then, a mono-PEGylated population of both proteins was obtained. The modelling of collinein-1 was obtained using the SWISS-MODEL tool, revealing that the protein has a structure like other SVSPs. The thermal stability analysis indicated that all forms of the protein have similar unfolding temperatures. PH 5.0 was the condition with the lowest unfolding temperature, while pH 7.0 was considered as the best condition for the stability of all forms of the enzyme. A significant increase in protein size was observed after PEGylation (collinein-1:  $4.0 \pm 0.4$  nm, PEG-collinein-1:  $9.9 \pm 1.1$  nm, rCollinein-1:  $4.9 \pm 1.3$  nm; PEG-rCollinein-1:  $10.7 \pm 1.3$  nm). On the other hand, no significant changes were seen in the content of secondary enzyme structures. The content of alpha-helices (7%, 5%, 2%, 15%), beta sheets (31%, 31%, 31%, 22%), turns (21%, 19%, 16%, 17%) and random coil elements (41%, 45%, 51%, 46%) for collinein-1, PEG-collinein-1, rCollinein-1 and PEG-rCollinein-1, respectively, showed that PEGylation did not interfere in the protein folding. The determination of kinetic parameters showed similar values of  $K_m$  between its different forms (collinein-1:  $0.920 \pm 0.079$  mM; rCollinein-1:  $1.243 \pm 0.113$  mM; PEG-collinein-1:  $1.317 \pm 0.117$  mM and PEG-rCollinein-1:  $1.4 \pm 0.119$  mM). However, the catalytic constant ( $k_{cat}$ ) and the specificity constant ( $k_{cat}/K_m$ ) were slightly different. rCollinein-1 showed higher values of these parameters ( $k_{cat} = 2.934 \pm 0.118$  s<sup>-1</sup> and  $k_{cat}/K_m = 2.4 \pm 0.115$  mM.s<sup>-1</sup>) when compared to collinein-1 ( $k_{cat} = 0.497 \pm 0.017$  s<sup>-1</sup> and  $k_{cat}/K_m = 0.5 \pm 0.048$  mM.s<sup>-1</sup>), PEG-collinein-1 ( $k_{cat} = 0.502 \pm 0.020$  s<sup>-1</sup> and  $k_{cat}/K_m = 0.4 \pm 0.068$  mM.s<sup>-1</sup>) and PEG-rCollinein-1 ( $k_{cat} = 1.286 \pm 0.050$  s<sup>-1</sup> and  $k_{cat}/K_m = 0.9 \pm 0.084$  mM.s<sup>-1</sup>). However, these results indicate that PEGylation was not harmful to the catalytic activity of native and recombinant forms, corroborating the results of fibrinogen degradation, which showed that all forms of the enzyme have catalytic activity on this substrate. However, it was observed that the inhibitory activity of PEGylated proteins was significantly lower in the hEAG1 channel ( $45.5 \pm 13.4\%$  to  $8.2 \pm 4.7\%$  and  $50.3 \pm 6.0\%$  to  $5.7 \pm 3.7\%$ , at 5  $\mu$ M, for the native and recombinant proteins, respectively), while there was an increase in activity in hERG1, with IC<sub>50</sub> values of  $22.4 \pm 1.1$   $\mu$ M and  $10.0 \pm 0.4$   $\mu$ M for PEG-collinein-1 and PEG-rCollinein-1, respectively. Other serinoproteases were tested on hEAG1 and the essential amino acid residues for the activity of these enzymes in this channel have been proposed. The absence of cytotoxicity in PBMC cells and the lack of *in vivo* immunogenicity evaluated in mice of PEGylated proteins are important results in the quest for therapeutic applicability. Overall, the PEGylation of these proteins directed their activity towards hemostasis control, broadening their possibilities to be used as defibrinogenant agents in pathological conditions such as stroke, thrombosis, and pulmonary embolism.

Keywords: SVSPs, heterologous expression, immunogenicity, therapeutic applicability.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição das subespécies de <i>Crotalus durissus</i> no território brasileiro.....	25
<b>Figura 2.</b> Proporção relativa de cada grupo de toxinas presentes na peçonha de <i>C. d. collilineatus</i> .....	26
<b>Figura 3.</b> Estrutura tridimensional do fibrinogênio humano.....	27
<b>Figura 4.</b> Estrutura e interações entre moléculas de fibrinogênio para formação do coágulo de fibrina.....	28
<b>Figura 5:</b> Toxinas de serpentes com ação sobre o sistema hemostático.....	29
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de ação das serinoproteases, ilustrando os oito passos do mecanismo de catálise.....	31
<b>Figura 7.</b> Possíveis aplicações terapêuticas das TLEs.....	32
<b>Figura 8.</b> Topologia das subunidades $\alpha$ do canal Nav humano.....	35
<b>Figura 9.</b> Estrutura genérica de um canal para potássio sensível à voltagem.....	38
<b>Figura 10.</b> Interação dos íons potássio e sódio com grupos carbonila ou carboxila no filtro de seletividade de um canal para potássio.....	39
<b>Figura 11.</b> <i>Docking</i> molecular entre a collineína-1 e o canal iônico hEAG1.....	41
<b>Figura 12.</b> Vista superior e inferior do <i>docking</i> molecular proposto entre a collineína-1 e o hEAG1.....	42
<b>Fig. 13.</b> Viabilidade celular das linhagens celulares MCF10A (A), MCF7 (B) e HepG2 (C), avaliada por MTT após o tratamento com diferentes concentrações de collineína-1.....	43
<b>Figura 14.</b> Principais meios de produção de proteínas recombinantes utilizadas atualmente....	46
<b>Figura 15.</b> Total de novos medicamentos aprovados para uso humano, entre 1993 e 2020 pelo FDA.....	48
<b>Figura 16.</b> Benefícios da PEGlação de proteínas e peptídeos na aplicação destas moléculas na área terapêutica.....	51
<b>Figura 17.</b> Possíveis sítios de PEGlação de proteínas e peptídeos.....	52
<b>Figura 18.</b> Esquema dos procedimentos realizados para a expressão e purificação da rCollineína-1 em sistema heterólogo, utilizando a levedura <i>P. pastoris</i> .....	61
<b>Figura 19.</b> Mapa do vetor de expressão pPICZ $\alpha$ .....	62
<b>Figura 20.</b> Mecanismo proposto da bioconjugação do mPEG-maleimide aos resíduos de lisina da collineína-1 e rCollineína-1, em pH 7,4.....	64

<b>Figura 21.</b> Condições utilizadas na segunda tentativa de obtenção de cristais da collineina-1 nativa.....	69
<b>Figura 22.</b> Etapas para a obtenção e uso de oócitos em experimentos de eletrofisiologia.....	72
<b>Figura 23.</b> Representação esquemática da técnica TEVC.....	74
<b>Figura 24.</b> Esquematização dos protocolos utilizados nos ensaios de eletrofisiologia, envolvendo os diferentes canais iônicos testados.....	76
<b>Figura 25.</b> Perfil cromatográfico da peçonha bruta de <i>C. d. collilineatus</i> em coluna de fase reversa C18 semipreparativa.....	83
<b>Figura 26.</b> Perfil cromatográfico da fração 32 em coluna de fase reversa C4.....	84
<b>Figura 27.</b> Espectro de massas da fração C2 obtido por MALDI-TOF.....	85
<b>Figura 28.</b> Perfil da SDS-PAGE (13,5%) das frações coletadas na cromatografia de afinidade a íons metálicos mobilizados (IMAC).....	88
<b>Figura 29.</b> Perfil cromatográfico dos componentes eluídos entre 50 e 75 mM de imidazol, em coluna de troca catiônica fraca CMC-52.....	90
<b>Figura 30.</b> Perfil da SDS-PAGE (13,5%) das frações coletadas na cromatografia de troca iônica em coluna CMC-52.....	90
<b>Figura 31.</b> Perfil cromatográfico da fração CM6 em coluna Mini S 4.6/50 PE.....	91
<b>Figura 32.</b> Perfil da SDS-PAGE (13,5%) das frações coletadas na cromatografia de troca iônica em coluna MiniS.....	92
<b>Figura 33.</b> Espectro de massas da fração M2 obtido por MALDI-TOF.....	92
<b>Figura 34.</b> Perfil da SDS-PAGE (13,5%) da collineina-1 nativa e recombinante, corado com ácido periódico e reagente de Schiff, para marcar glicoproteínas.....	95
<b>Figura 35.</b> Análise de possíveis sítios de N-glicosilação da collineina-1 pela ferramenta <i>in silico</i> NetNGlyc.....	96
<b>Figura 36.</b> Perfil cromatográfico da PEG-collineina-1 em coluna de fase reversa C4.....	98
<b>Figura 37.</b> Perfil da SDS-PAGE (10%) das frações coletadas na cromatografia em fase reversa da PEG-collineina-1.....	98
<b>Figura 38.</b> Perfil cromatográfico da collineina-1 recombinante PEGlada (PEG-rCollineina-1) em coluna de fase reversa C4.....	100
<b>Figura 39.</b> Perfil da SDS-PAGE (10%) das frações coletadas na cromatografia em fase reversa da PEG-rCollineina-1.....	100
<b>Figura 40.</b> Perfis de curva de termoestabilidade da collineina-1, PEG-collineina-1, rCollineina-1 e PEG-rCollineina-1, em diferentes condições (pH 5,0 a 10,0).....	104

<b>Figura 41.</b> Efeito de soluções-tampão e diferentes pHs na estabilidade térmica da collineína-1 (colunas em vermelho) e PEG-collineína-1 (colunas em azul).....	106
<b>Figura 42.</b> Estrutura de modelagem molecular da collineína-1.....	109
<b>Figura 43.</b> Índices de qualidade apresentados pela ferramenta <i>online</i> SWISS-MODEL.....	110
<b>Figura 44.</b> (A) Estrutura de modelagem molecular da collineína-1 com destaque para os resíduos de cisteína envolvidos em ligações dissulfeto intramoleculares. (B) Destaque para os resíduos do sítio catalítico.....	111
<b>Figura 45.</b> Sobreposição das estruturas obtidas por modelagem molecular no SWISS-MODEL (em vermelho) e nos estudos de <i>docking</i> molecular (em azul).....	112
<b>Figura 46.</b> Distribuição de tamanho por massa das diferentes formas da enzima.....	113
<b>Figura 47.</b> Molécula do derivado de PEG <i>methoxypolyethylene glycol maleimide</i> .....	114
<b>Figura 48.</b> Estrutura de modelagem da collineína-1 nativa com os possíveis sítios de PEGlgação destacados.....	115
<b>Figura 49.</b> Espectros de dicroísmo circular obtidos para as quatro formas da enzima.....	117
<b>Figura 50.</b> Comparação entre o conteúdo de estrutura secundária da collineína-1 nativa, recombinante e suas formas PEGladas.....	118
<b>Figura 51.</b> Pontos de nucleação da collineína-1 nativa.....	120
<b>Figura 52.</b> Curva cinética de formação de produto <i>versus</i> tempo de reação das diferentes formas da enzima.....	122
<b>Figura 53.</b> Curva cinética de Michaelis-Menten das diferentes formas da enzima.....	123
<b>Figura 54.</b> Atividade fibrinogenolítica da collineína-1 nativa (A), nativa PEGlada (B), recombinante (C) e recombinante PEGlada (D).....	126
<b>Figura 55.</b> Efeito da adição de 10 $\mu$ M de mPEG-maleimide (5 kDa) nas correntes dos canais iônicos hEAG1 e hERG1.....	128
<b>Figura 56.</b> Atividade da (A) PEG-collineína-1 e (B) PEG-rCollineína-1 nos canais iônicos hEAG1 e hERG1.....	129
<b>Figura 57.</b> Análise comparativa da inibição das diferentes formas da collineína-1, a 5 $\mu$ M, nos canais para potássio hEAG1 e hERG1.....	130
<b>Figura 58.</b> Relação voltagem-corrente do canal hERG1 na presença de PEG-collineína-1 (A) e PEG-rCollineína-1 (B).....	131
<b>Figura 59.</b> Curvas de dose-resposta da PEG-collineína-1 (A) e PEG-rCollineína-1 (B), no canal iônico hERG1.....	132
<b>Figura 60.</b> Avaliação eletrofisiológica da PEG-rCollineína-1 em diferentes canais para potássio dependentes de voltagem.....	134

<b>Figura 61.</b> Avaliação eletrofisiológica da PEG-rCollineina-1 em diferentes canais para sódio e cálcio dependentes de voltagem.....	135
<b>Figura 62.</b> Alinhamento indicando parte da sequência dos canais Kv10.1a e Kv10.1b.....	136
<b>Figura 63.</b> Mutações realizadas no hEAG1.....	137
<b>Figura 64.</b> Atividade da collineina-1 (5 $\mu$ M) em diferentes mutantes do canal hEAG1.....	138
<b>Figura 65.</b> Inibição da corrente nos canais mutantes no domínio sensível à voltagem do hEAG1 pela forma nativa da collineina-1.....	139
<b>Figura 66.</b> Perfil eletrofisiológico da giroxina (A), BjSP (B) e quimotripsina (C) no canal iônico hEAG1.....	141
<b>Figura 67.</b> Viabilidade de células PBMC após exposição a (A) collineina-1; (B) PEG-collineina-1; (C) rCollineina-1 e (D) PEG-rCollineina-1, por 24 h.....	144
<b>Figura 68.</b> Modelagem da estrutura da collineina-1 com destaque dos prováveis sítios de PEGlação e possíveis peptídeos imunogênicos.....	147
<b>Figura 69.</b> Análise da produção de anticorpos totais em camundongos após a aplicação de salina (C-), collineina-1, PEG-collineina-1, rCollineina-1 e PEG-rCollineina-1.....	149

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Medicamentos PEGlados aprovados pelo FDA para uso em humanos.....	53
<b>Tabela 2.</b> Recuperação da collineina-1 nativa da peçonha de <i>C. d. collilineatus</i> nos passos cromatográficos utilizados para o seu isolamento.....	84
<b>Tabela 3.</b> Sequenciamento amino-terminal dos resíduos de aminoácidos das duas bandas eletroforéticas obtidas durante a produção heteróloga da rCollineina-1.....	88
<b>Tabela 4.</b> Recuperação da collineina-1 recombinante nos passos cromatográficos utilizados para o seu isolamento.....	93
<b>Tabela 5.</b> Recuperação da collineina-1 nativa PEGlada nos passos cromatográficos utilizados para sua purificação.....	99
<b>Tabela 6.</b> Recuperação da PEG-rCollineina-1 nos passos cromatográficos utilizados para sua purificação.....	101
<b>Tabela 7.</b> Temperatura de desenovelamento (°C) da collineina-1, PEG-collineina-1, rCollineina-1 e PEG-rCollineina-1, em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e Tris-HCl 50 mM (pH 7,0).....	105
<b>Tabela 8.</b> Valores de $\Delta T_m$ relacionando a estabilidade das formas PEGladas e não-PEGladas da collineina-1 nativa e recombinante, em diferentes valores de pH.....	107
<b>Tabela 9.</b> Concentração das amostras utilizadas na análise de dicroísmo circular.....	117
<b>Tabela 10.</b> Parâmetros cinéticos das diferentes formas da collineina-1, para o substrato cromogênico S-2302.....	124
<b>Tabela 11.</b> Comparação de resíduos participantes de diferentes serinoproteases na interação com o hEAG1, de acordo com o modelo proposto.....	142
<b>Tabela 12.</b> Possíveis peptídeos imunogênicos na sequência da rCollineina-1.....	146

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AChR: receptor de acetilcolina (*acetylcholine receptor*)
- ACN: acetonitrila
- ADAs: Anticorpos contra medicamentos (*anti-drug antibodies*)
- AF: ácido fórmico
- ANOVA: análise de variância
- BMGY: meio de cultura tamponado complexo com glicerol (*buffered glycerol-complex medium*)
- BMM: meio de cultura tamponado mínimo com metanol (*Buffered minimal metanol*)
- BMMY: meio de cultura tamponado complexo com metanol (*buffered methanol-complex medium*)
- BTX: batracotoxina
- Cav: canais para cálcio dependentes de voltagem
- CD: Dicroísmo circular (*circular dichroism*)
- CNPEM: centro nacional de pesquisa em energia e materiais
- CRISP: Proteínas secretadas ricas em cisteína (*Cysteine-Rich Secretory Proteins*)
- DHB: ácido 2,5-dihidroxibenzóico
- DLS: Espalhamento dinâmico de luz (*dynamic light scattering*)
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- EAG: ether-a-go-go
- ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
- ELK: ether-a-go-go símile (*ether-a-go-go-like*)
- ERG: gene relacionado ao ether-a-go-go (*ether-a-go-go-related gene*)
- Fator XIIIa: fator XIII ativado
- FCFRP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
- FDA: Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (*US food and drug Administration*)
- FpA: fibrinopeptídeo A
- FpB: fibrinopeptídeo B
- FPLC: Cromatografia líquida rápida de proteínas (*fast protein liquid chromatography*)
- g: gravidade
- GMQE: Estimativa global da qualidade do modelo (*global model quality estimation*)
- hEAG1: ether-a-go-go humano (*human ether-a-go-go*)

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis

IMAC: cromatografia de afinidade a íons metálicos imobilizados (*immobilized metal ion affinity chromatography*)

Kv: canais para potássio dependentes de voltagem

MALDI: ionização e dessorção a laser assistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption/ionization*)

MRE: elipticidade média por resíduo (*mean residue ellipticity*)

MS: espectrometria de massas (*mass spectrometry*)

Nav: canais para sódio dependentes de voltagem

nm: nanômetros

OmpF: Porina de membrana externa do tipo F (*outer membrane porin F*)

OPR: fase de leitura aberta (*open reading frame*)

PBS: tampão fosfato-salino

Pd: índice de polidispersividade

PDB: Banco de dados de proteínas (*protein data bank*)

PEG: polietilenoglicol

pNA: paranitroanilina

rDNA: DNA recombinante

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*)

SEM: Erro padrão da média (*standard error of the mean*)

SFB: soro fetal bovino

SNC: sistema nervoso central

SNP: sistema nervosa periférico

STX: saxitoxina

SVSPs: Serinoproteases de peçonhas de serpentes (*snake venom serine proteases*)

TAME: *N* $\alpha$ -*p*-Tosyl-*L*-arginine methyl ester

TEVC: Fixação de voltagem baseada em dois microeletrodos (*two-electrode voltage clamp*)

TFA: ácido trifluoroacético

TLEs: enzimas trombina-símile (*thrombin-like enzymes*)

TOF: tempo de voo (*time-of-flight*)

TTX: tetrodotoxina

VSD: domínio sensível à voltagem (*voltage-sensor domain*)

YNB: base nitrogenada de levedura (*yeast nitrogen base*)

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>24</b>
1.1. Espécies de serpentes do gênero <i>Crotalus</i> e suas principais toxinas .....	24
1.2. Serinoproteases de peçonhas de serpentes e o sistema hemostático.....	26
1.3. Toxinas animais e canais iônicos.....	32
1.3.1. Canais para sódio dependentes de voltagem .....	34
1.3.2. Canais para potássio dependentes de voltagem .....	36
1.3.3. Collineina-1 e o canal para potássio hEAG1 .....	40
1.4. Expressão de toxinas animais em sistema heterólogo .....	44
1.5. Produção, PEGlação e o mercado farmacêutico de proteínas recombinantes .....	47
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>56</b>
2.1. Objetivos gerais .....	56
2.2. Objetivos específicos .....	56
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>59</b>
3.1. Obtenção da peçonha de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> .....	59
3.2. Quantificação de proteínas .....	59
3.3. Purificação da collineina-1 nativa, a partir da peçonha de <i>C. d. collilineatus</i> .....	59
3.4. Obtenção da collineina-1 recombinante (rCollineina-1) .....	60
3.4.1. Expressão da collineina-1 recombinante em sistema heterólogo .....	61
3.4.2. Purificação da collineina-1 recombinante .....	62
3.5. Modificação química com mPEG-maleimide e purificação da collineina-1 nativa e recombinante PEGladas .....	63
3.6. Avaliação <i>in silico</i> de sequências de nucleotídeos de diferentes serinoproteases .....	64
3.7. Caracterização estrutural .....	65
3.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) .....	65
3.7.2. Eletroforese para determinar a presença de proteínas glicosiladas .....	65
3.7.3. Sequenciamento amino-terminal .....	65
3.7.4. Determinação da massa íntegra das formas nativa e recombinante da collineina-1 por espectrometria de massas .....	66

3.7.5. Análise da estabilidade térmica .....	66
3.7.6. Determinação in silico da estrutura terciária da collineína-1 por modelagem molecular .....	67
3.7.7. Determinação do tamanho de partícula .....	68
3.7.8. Avaliação de estruturas secundárias de proteínas por dicroísmo circular .....	68
3.7.9. Estudos cristalográficos .....	68
3.8. Caracterização funcional e bioquímica.....	70
3.8.1. Cinética enzimática.....	70
3.8.2. Atividade fibrinogenolítica.....	71
3.8.3. Atividade em canais iônicos .....	71
3.8.3.1. Seleção, preparação e injeção de RNA em oócitos de <i>X. laevis</i> .....	72
3.8.3.2. Caracterização eletrofisiológica .....	73
3.8.3.3. Protocolos utilizados nos experimentos de eletrofisiologia .....	76
3.8.4. Avaliação da citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) .....	77
3.8.4.1. Extração de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) .....	77
3.8.4.2. Técnica de coloração pelo brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) .....	77
3.8.5. Predição de epítomos para células T – Ligação ao MHC classe II .....	78
3.8.6. Avaliação da imunogenicidade das diferentes formas da collineína-1 em camundongos	79
3.8.6.1. Tratamento dos animais com as diferentes formas da collineína-1 .....	79
3.8.6.2. Avaliação da produção de anticorpos utilizando ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) .....	79
3.9. Análise estatística .....	80
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>83</b>
4.1. Purificação da collineína-1 nativa a partir da peçonha bruta de <i>C. d. collilineatus</i> .....	83
4.2. Expressão e purificação da collineína-1 recombinante .....	86
4.3. Avaliação da presença de glicosilações na collineína-1 .....	94
4.4. Obtenção das formas PEGladas da collineína-1 nativa e recombinante.....	97
4.5. Caracterização estrutural .....	102
4.5.1. Avaliação da termoestabilidade.....	102
4.5.2. Modelagem molecular .....	108
4.5.3. Determinação do tamanho de partícula através da técnica de DLS.....	112
4.5.4. Avaliação do conteúdo de estruturas secundárias .....	116
4.5.5. Cristalização da collineína-1 nativa.....	119

4.6. Caracterização funcional e bioquímica.....	121
4.6.1. Cinética enzimática.....	121
4.6.2. Avaliação da atividade fibrinogenolítica .....	125
4.6.3. Atividade em canais iônicos .....	127
4.6.3.1. Comparação da atividade das formas PEGladas e não PEGladas da collineina-1 nos canais iônicos hEAG1 e hERG1 .....	127
4.6.3.2. Avaliação da ação da collineina-1 no canal hEAG1 com mutações no domínio sensível à voltagem e porção intracelular.....	136
4.6.3.3. Atividade de outras serinoproteases no canal iônico hEAG1 .....	140
4.7. Avaliação da citotoxicidade das diferentes formas da collineina-1 em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) .....	143
4.8. Predição <i>in silico</i> de determinantes antigênicos .....	145
4.9. Imunogenicidade das diferentes formas da collineina-1 em camundongos .....	148
<b>5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>152</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>155</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>1777</b>

---

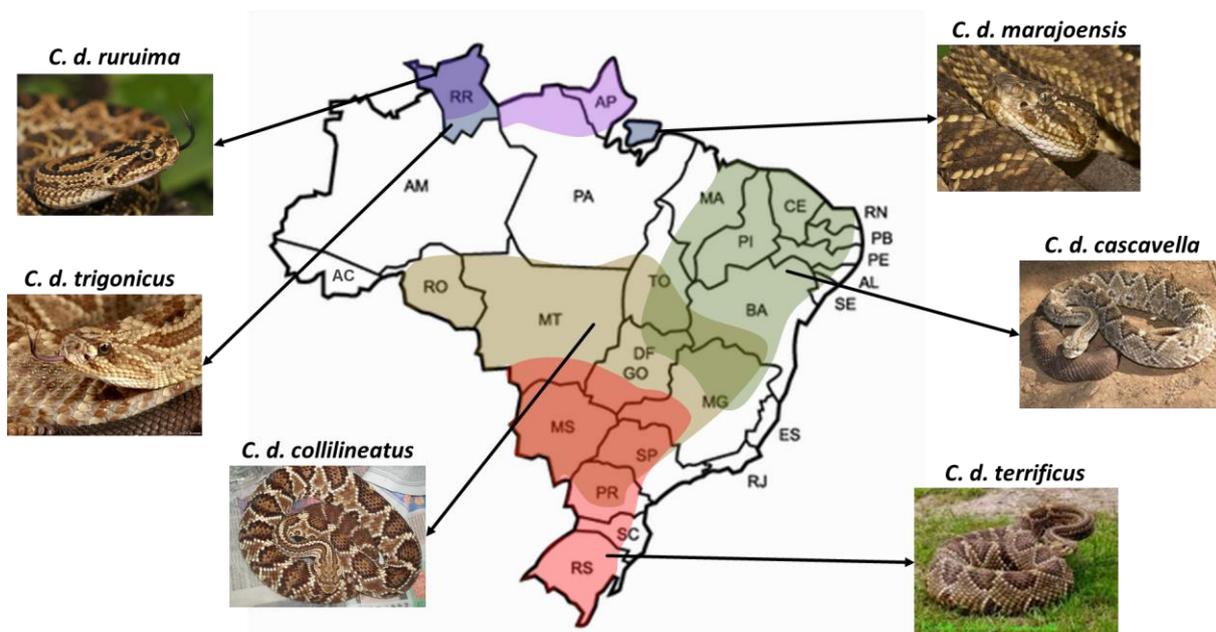
# **INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA**

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Espécies de serpentes do gênero *Crotalus* e suas principais toxinas

As espécies de serpentes peçonhentas, presentes na superfamília Colubroidea, são divididas em quatro famílias principais: Colubridae, Viperidae, Elapidae e Atractaspidae, com predominância de espécies da família Viperidae no território brasileiro (LAWSON et al., 2005). As peçonhas das espécies pertencentes a essas famílias refletem uma inovação marcante em relação às serpentes não peçonhentas, permitindo a transição de um mecanismo de caça mecânica – constrição, para um mecanismo químico – peçonha, viabilizando a captura de presas maiores que elas mesmas. Deste modo, a peçonha destes animais apresenta diversas proteínas com as mais variadas funções, que agem em sinergia, levando à imobilização, paralisção, digestão e morte de suas vítimas. Nas peçonhas de serpentes da família Viperidae, observa-se a presença de proteínas que interferem, principalmente, no sistema hemostático e reparo tecidual. Assim, o envenenamento em humanos é geralmente caracterizado por distúrbios na coagulação, hipofibrinogenemia, além de necrose no local da picada (SANZ et al., 2008).

A família Viperidae compreende, atualmente, três subfamílias: Azemiopinae, Viperinae e Crotalinae. Presente na subfamília Crotalinae, o gênero *Crotalus* apresenta pelo menos 29 espécies. No Brasil, encontra-se somente uma espécie desse gênero, denominada *Crotalus durissus* (Fig. 1), com a presença de seis subsespécies, sendo *C. d. ruruima*, *C. d. marajoensis*, *C. d. terrificus*, *C. d. cascavella*, *C. d. trigonicus* e *C. d. collilineatus* (OSHIMA-FRANCO Y, 1998; MURPHY, 2002; UETZ et al., 2016), embora as subespécies *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus* sejam as mais prevalentes (BOLDRINI-FRANCA et al., 2010).



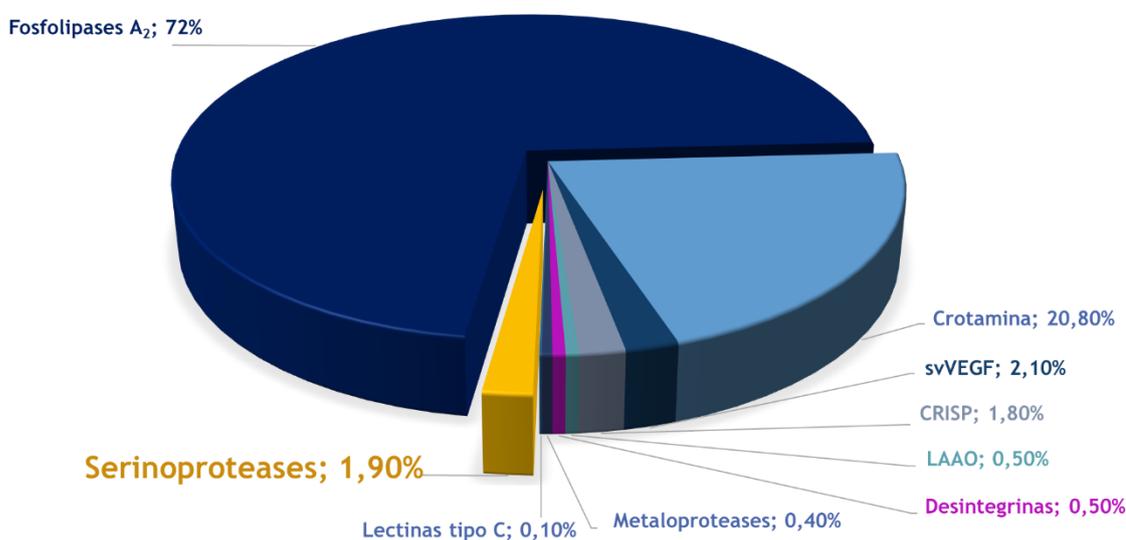
**Figura 1. Distribuição das subespécies de *Crotalus durissus* no território brasileiro.** Figura elaborada pelo autor, com base nos dados de Boldrini-França et al., 2010 e reptile-database.org.

Proporcionalmente, o acidente crotálico apresenta um grande índice de letalidade quando comparado àqueles ocasionados por outras serpentes peçonhentas no Brasil. A peçonha destes animais é conhecida pela capacidade de dissociar a transmissão neuromuscular, além de provocar sintomas miálgicos. A neurotoxicidade sistêmica é frequentemente acompanhada por rabdomiólise, causando necrose tubular aguda e falência renal, sendo a causa primária de morte decorrida das complicações do acidente crotálico (OSHIMA-FRANCO et al., 1999; CARDOSO, 2003).

A miotoxicidade e neurotoxicidade sistêmica são principalmente atribuídas à alta concentração da crotoxina. Esta é uma toxina heterodimérica, formada por uma fosfolipase do tipo A<sub>2</sub>, que exibe  $\beta$ -neurotoxicidade pré-sináptica, bloqueando a transmissão neuromuscular através da redução da liberação de acetilcolina, e uma subunidade não enzimática, chamada de crotoxina A ou crotapotina, responsável por direcionar o complexo para uma ação no sistema nervoso (HABERMANN e BREITHAUPT, 1978; SAMPAIO et al., 2010). Esta toxina representa de 70 a 90% dos componentes presentes na peçonha de *Crotalus durissus* ssp. e é responsável por causar os principais sintomas do acidente crotálico (BON et al., 1989).

Além da crotoxina, a peçonha desta espécie apresenta três toxinas em proporções relevantes: (1) crotamina, uma toxina mionecrótica com conformação de  $\beta$ -defensina, agindo nos canais para sódio e potássio sensíveis à voltagem (CHANG e TSENG, 1978; PEIGNEUR et al., 2012), (2) giroxina, uma serinoprotease trombina-símile responsável por induzir uma

síndrome neurológica em camundongos, denominada síndrome de Barrel, e incoagulabilidade sanguínea (YONAMINE et al., 2012), e (3) convulxina, que pertence à classe das lectinas tipo-C e induz a agregação plaquetária e quadros convulsivos (FRANCISCHETTI et al., 1997). Entretanto, nos estudos de transcriptoma da glândula de *C. d. collilineatus*, realizados por Boldrini-França e colaboradores (2009; 2010), e estudos proteômicos efetuados por Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA et al., 2019) foram encontradas, em menores proporções, metaloproteases, fatores de crescimento, CRISP (*Cysteine-Rich Secretary Proteins*) desintegrinas, fator de crescimento neural, fosfodiesterases, fosfolipase B, entre outras toxinas (Fig. 2).



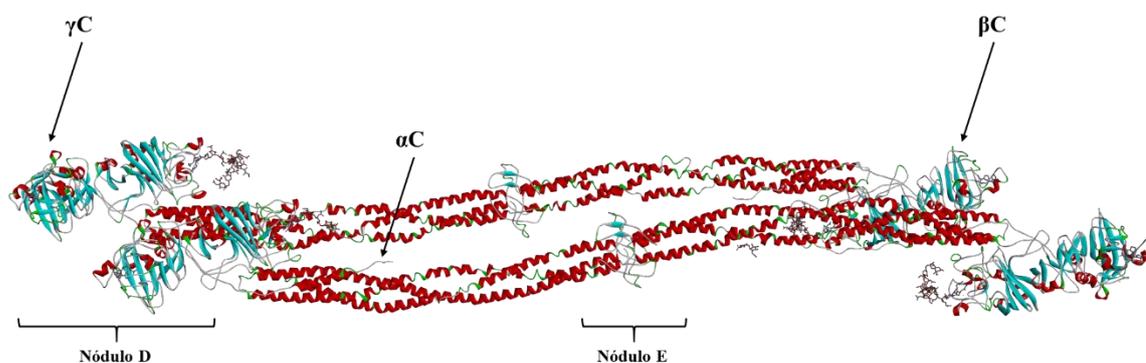
**Figura 2.** Proporção relativa de cada grupo de toxinas presente na peçonha de *C. d. collilineatus*. Figura elaborada pelo autor, com base nos dados de Boldrini-França et al., 2010.

### 1.2. Serinoproteases de peçonhas de serpentes e o sistema hemostático

A hemostasia é um componente crítico da preservação da estabilidade hemodinâmica. Assim, envolve não apenas a formação do coágulo sanguíneo, mas também sua decorrente dissolução. O ponto final do primeiro processo, que consiste na formação do coágulo de fibrina, pode ser alcançado através de duas vias distintas: intrínseca e extrínseca. Ambas as vias envolvem uma série de reações enzimáticas que terminam na formação de trombina, componente responsável por clivar o fibrinogênio em sua forma insolúvel, fibrina, além de ativar o fator XIII da coagulação, responsável por promover ligações cruzadas entre os monômeros de fibrina. As vias da coagulação são compostas por zimogênios de

serinoproteases, nas quais enzimas funcionais ativam umas às outras. O coágulo sanguíneo, formado no local de injúria e hemorragia, é composto pela deposição de fibrina, juntamente com as plaquetas, a fim de reparar a área danificada nos vasos sanguíneos (BRAUD et al., 2000; OVERBEY et al., 2014).

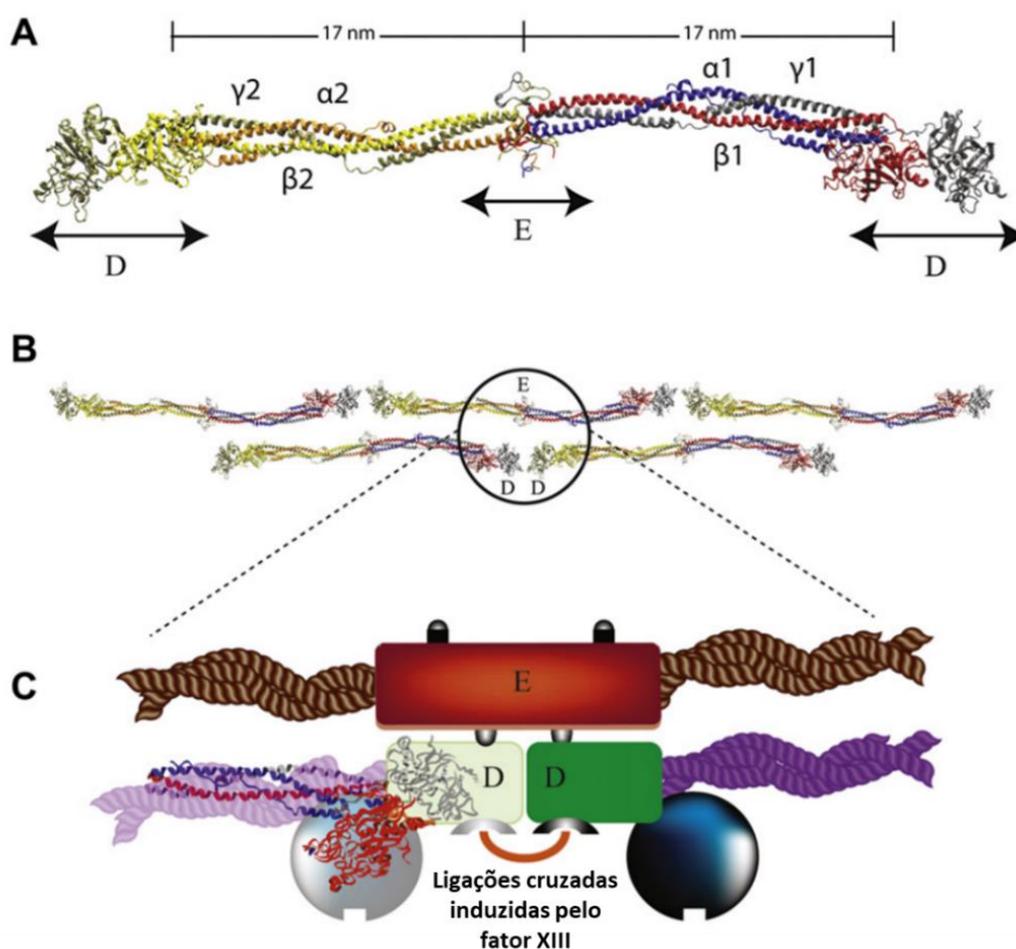
O fibrinogênio (fator I) é uma glicoproteína sintetizada pelo fígado, presente na circulação sanguínea dos vertebrados, participando do processo de formação de coágulos sanguíneos. Este fator consiste de um arranjo de dois pares de três cadeias polipeptídicas, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , unidas entre si por 29 ligações dissulfeto (HALL e SLAYTER, 1959; JUNG et al., 2003; RIEDEL et al., 2011). É uma molécula solúvel, com massa molecular de aproximadamente 340 kDa. Estruturalmente, apresenta um caráter alongado, com dois nódulos principais, denominados D e E (Fig. 3). O nódulo central (E) contém as porções N-terminais das seis cadeias. Essas cadeias partem deste nódulo central em dois conjuntos de estruturas com três alfa-hélices, conduzindo ao nódulo distal (D). Cada nódulo D contém as porções C-terminais, com enovelamentos independentes, das cadeias  $B\beta$  e  $\gamma$ , denominadas  $\beta C$  e  $\gamma C$ , respectivamente. A porção C-terminal das cadeias  $A\alpha$ , denominada  $\alpha C$ , deixa o nódulo D, com uma curta distância, como uma quarta cadeia, e se estende ao longo da superfície da proteína, em direção ao nódulo central (LORD, 2007).



**Figura 3. Estrutura tridimensional do fibrinogênio humano.** Estrutura cristalográfica renderizada utilizando programa Discovery Studio 4.1 (Accelrys®). Código PDB: 3GHG. Imagem elaborada pelo autor.

A conversão de fibrinogênio em fibrina ocorre pela clivagem das cadeias  $A\alpha$  e  $B\beta$  pela trombina, liberando os fibrinopeptídeos A (FpA) e B (FpB), respectivamente. A remoção destes fibrinopeptídeos expõe os sítios de polimerização das porções N-terminais das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , chamados de botões 'A' e 'B'. As novas porções N-terminais interagem com sítios de

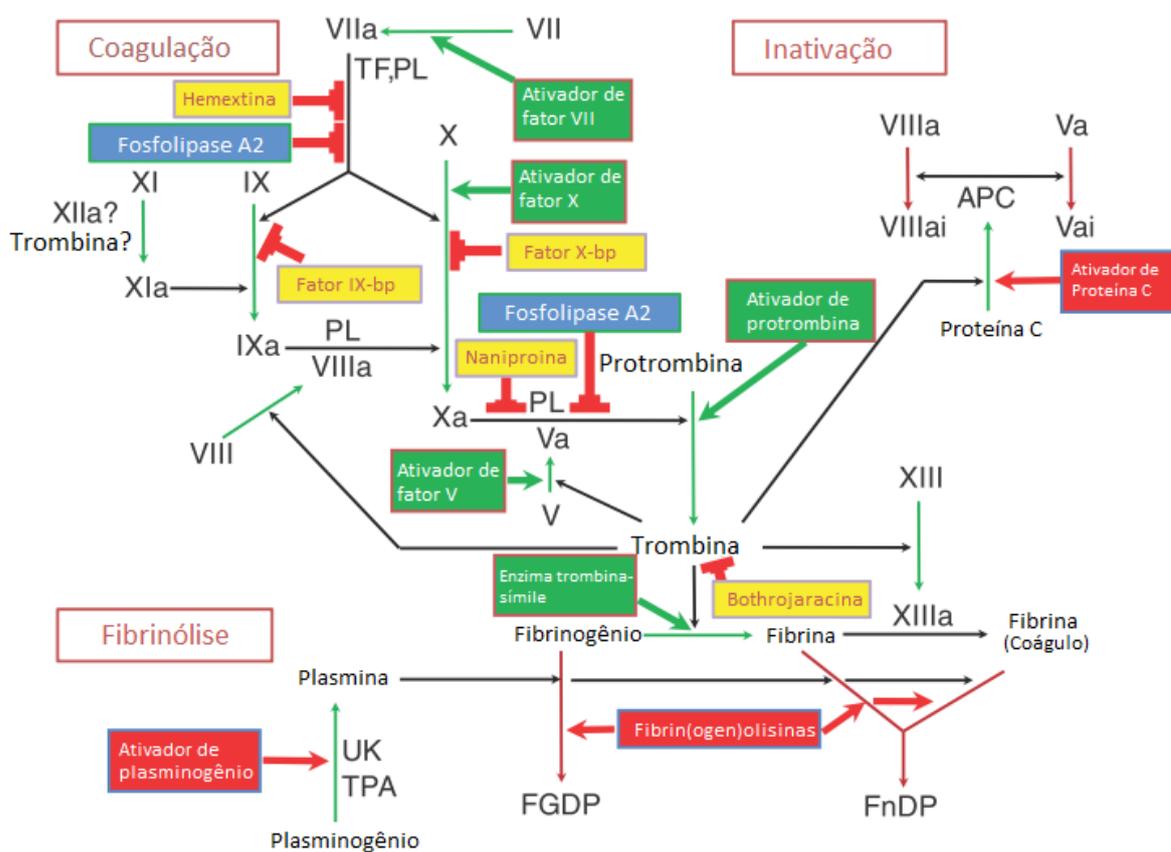
polimerização, denominados de cavidades ‘a’ e ‘b’ nas porções  $\gamma$ C e  $\beta$ C, formando as interações ‘A:a’ e ‘B:b’. Em seguida, a polimerização ocorre em duas etapas: (1) formação de protofibrilos de cadeia dupla e (2) agregação lateral de protofibrilos em fibras (Fig. 4). As interações ‘A:a’ auxiliam na formação dos protofibrilos, enquanto ‘B:b’ influenciam na agregação lateral destas cadeias. A trombina também catalisa a ativação do fator XIII (fator XIII  $\rightarrow$  fator XIIIa), o qual catalisa a formação de ligações isopeptídicas entre as cadeias  $\gamma$  de duas moléculas de fibrina, formando dímero  $\gamma$ - $\gamma$ , e entre as cadeias  $\alpha$ , originando  $\alpha$ -polímeros. Estes polímeros de ligações cruzadas são mais resistentes à fibrinólise do que aqueles que não as possuem (LORD, 2007).



**Figura 4. Estrutura e interações entre moléculas de fibrinogênio para formação do coágulo de fibrina.** (A) Estrutura cristalográfica do fibrinogênio (código PDB: 1M1J), mostrando a região central E, conectada às regiões distais D pelas estruturas denominadas  $\alpha 1\beta 1\gamma 1$  e  $\alpha 2\beta 2\gamma 2$ . (B) e (C) Diagrama esquemático de um protofibril de fibrina mostrando em (B) a configuração em cadeia dupla semi-escalonada e em (C) as interações trimodulares entre as regiões E central e D distal, destacando as ligações cruzadas induzidas pelo fator XIII. Adaptado de LIM et al., 2008.

O fibrinogênio e a fibrina fornecem a estrutura de suporte necessária para que o processo de coagulação sanguínea ocorra. Na fase inicial de formação do coágulo, o fibrinogênio atua como uma molécula suporte, mediando a agregação plaquetária. Subsequentemente, o fibrinogênio é convertido à uma matriz de fibrina, dando forma, consistência, flexibilidade e estabilidade ao coágulo formado (LORD, 2007).

Diversas toxinas presentes em peçonhas de serpentes possuem o sistema hemostático como alvo, como as metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases do tipo A<sub>2</sub>, ADPases, 5'-nucleotidasas e L-aminoácido oxidases (KINI, 2011). Estas proteínas apresentam mecanismos de ação distintos, podendo ativar, inibir ou modular a atividade de diversos componentes presentes neste sistema (Fig. 5).

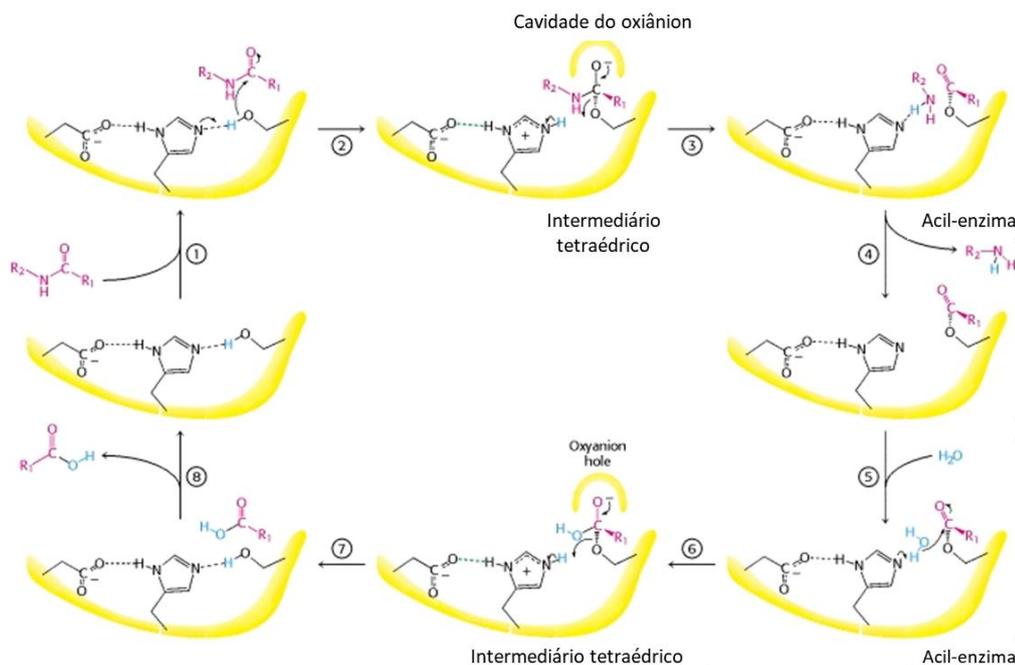


**Figura 5: Toxinas de serpentes com ação sobre o sistema hemostático.** As proteases agem através da clivagem de fatores específicos (setas em vermelho), enquanto outras toxinas agem através de interações com os componentes deste sistema (blocos vermelhos). As caixas em verde indicam proteases pró-coagulantes. As caixas vermelhas referem-se às proteases anticoagulantes e proteases que afetam a fibrinólise. Caixas azuis indicam fosfolipases A<sub>2</sub>, enquanto as caixas amarelas indicam proteínas sem ação enzimática. Adaptado de KINI (2011).

As peçonhas de serpentes das subfamílias Viperinae e Crotalinae possuem um grande número de proteínas e peptídeos que apresentam a capacidade de afetar o sistema hemostático de suas presas. Estes compostos são classificados como coagulantes, anticoagulantes ou fatores fibrinolíticos. O quadro de envenenamento por estas serpentes muitas vezes resulta em hemorragia persistente, uma vez que os componentes da peçonha causam depleção acentuada de fibrinogênio e outros fatores de coagulação, impedindo a formação do coágulo sanguíneo (BRAUD et al., 2000; SERRANO e MAROUN, 2005).

As serinoproteases de peçonhas de serpentes (SVSPs – *Snake Venom Serine Proteases*) pertencem a um grupo de proteínas chamadas peptidases, consistindo em uma das principais classes de proteínas que atuam no sistema hemostático durante o quadro de envenenamento. No geral, as SVSPs afetam as vias presentes nos mecanismos de controle da hemostasia, ativando ou inativando, especificamente, componentes do sangue envolvidos na coagulação, fibrinólise, agregação plaquetária e sistema calicreína-cinina (HALFON e CRAIK, 1998; SERRANO e MAROUN, 2005).

Com relação ao seu sítio ativo, as SVSPs possuem a tríade catalítica similar a todas as serinoproteases (Fig. 6), e a numeração dos resíduos do sítio catalítico foi determinada de acordo com a sequência de aminoácidos da tripsina. O resíduo de serina, na posição 195, atua como nucleófilo, a histidina 57 tem o papel de acceptor/doador de prótons, enquanto a asparagina 102 age como indutor eletronegativo (PRADNIWAT e ROJNUCKARIN, 2014). A reação, ilustrada na figura 6, apresenta oito passos: **(1)** abstração do próton da cadeia lateral do resíduo de serina, ocasionando em um ataque nucleofílico à ligação peptídica do substrato; **(2)** formação do intermediário tetraédrico; **(3)** formação de acil-enzima; **(4)** remoção do componente amina da enzima (metabolizado pelo organismo) e ligação à serina, completando o primeiro estágio (acilação da enzima), resultando no primeiro produto da reação; **(5)** uma molécula de água é adicionada no local onde estava a região N-terminal. A histidina desprotona a água para formar um ânion hidróxido, o qual ataca o carbono do lado carboxi e desestabiliza o intermediário acil; **(6)** uma molécula de água é desprotonada por catálise ácido-base, gerando um íon de hidróxido fortemente nucleofílico, que ataca a ligação éster da acilenzima, gerando um segundo intermediário tetraédrico; **(7)** e **(8)** representam o rearranjo molecular do segundo produto, causando sua liberação e reconstrução do sítio ativo da enzima (BERG et al., 2002).



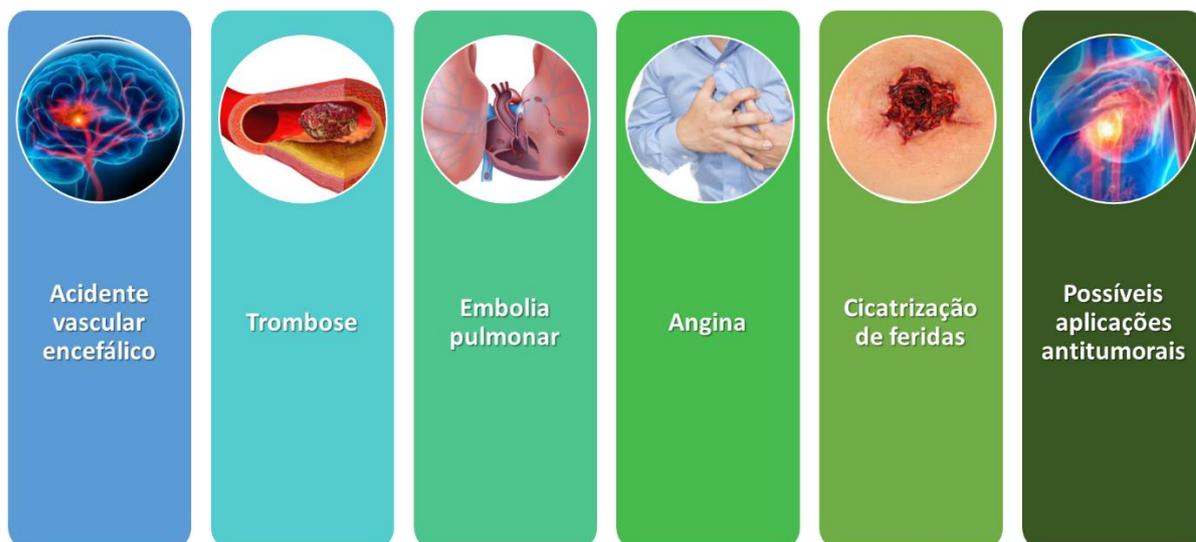
**Figura 6. Mecanismo de ação das serinoproteases, ilustrando os oito passos do mecanismo de catálise.** Adaptado de BERG et al., 2002.

As enzimas trombina-símile (TLEs – *Thrombin-like enzymes*) são serinoproteases presentes em peçonhas de serpentes e possuem atividade proteolítica sobre o fibrinogênio. Similar à produção de fibrina pela trombina endógena, as TLEs liberam fibrinopeptídeos pela clivagem da ligação Arg-Lys nas cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do fibrinogênio. Entretanto, enquanto a trombina é capaz de clivar o fibrinogênio em ambas as cadeias, liberando tanto o fibrinopeptídeo A, quanto fibrinopeptídeo B, as TLEs clivam, preferencialmente, apenas uma destas cadeias (PRADNIWAT e ROJNUCKARIN, 2014).

De acordo com a ação seletiva destas enzimas nas cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , as TLEs podem ser classificadas em três classes: A, agindo preferencialmente sobre a cadeia  $\alpha$ ; B, atuando preferencialmente na cadeia  $\beta$ ; ou AB, agindo indistintamente nas duas cadeias. A maioria das TLEs de peçonhas de serpente é classificada na classe A. Contudo, uma TLE pertencente à classe B foi encontrada na peçonha de *Agkistrodon contortrix contortrix*, denominada contortrixobina (AMICONI et al., 2000). TLEs da classe AB também foram purificadas da peçonha de *A. bilineatus* (KOMORI et al., 1993) e *A. blomhoffii brevicaudus* (LEE et al., 1999).

Todavia, a grande maioria das TLEs não é capaz de ativar o Fator XIII, responsável por formar as ligações cruzadas entre os monômeros de fibrina. Desta maneira, origina-se apenas um coágulo frouxo, facilmente degradado pelo sistema fibrinolítico do organismo

(MACKESSY, 2010; PRADNIWAT e ROJNUCKARIN, 2014). Dadas estas características únicas, as TLEs possuem potencial para serem aplicadas como agentes terapêuticos em distúrbios trombóticos, como trombose de vasos profundos ou acidente vascular encefálico isquêmico, além de outras possíveis aplicações (Fig. 7).



**Figura 7. Possíveis aplicações terapêuticas das TLEs.** Imagem elaborada pelo autor.

### 1.3. Toxinas animais e canais iônicos

Os canais iônicos desempenham funções cruciais na geração de potenciais de ação e, conseqüentemente, em outras atividades celulares, como transdução de sinal, liberação de neurotransmissores, contração muscular, secreção de hormônios, mobilidade celular e apoptose (KIM, 2014; IMBRICI et al., 2016). Tais estruturas constituem o terceiro maior grupo de moléculas de sinalização codificadas pelo genoma humano (WULFF et al., 2009). Neste contexto, houve um aumento expressivo envolvendo o estudo destas proteínas e seus respectivos mecanismos, sendo que grande parte do conhecimento adquirido, envolvendo a identificação, caracterização estrutural e funcional, bem como sua distribuição nos organismos, foi feita com o auxílio de neurotoxinas. Além disso, o uso dessas toxinas também contribuiu na caracterização de canais iônicos envolvidos em processos fisiopatológicos, como câncer, doenças autoimunes, mal de Parkinson e Alzheimer, esclerose múltipla, entre outros (IMBRICI et al., 2016; CARBONE e MORI, 2020).

O fenômeno da excitabilidade elétrica é uma das propriedades mais significativas e inatas dos neurônios. Como a maioria das células eucarióticas, os neurônios mantêm um

gradiente iônico em sua membrana, de modo que o líquido intracelular contenha uma alta concentração de íons de potássio e baixa concentração de íons de sódio e cálcio em relação ao líquido extracelular. Esses gradientes são mantidos pela ação de bombas de íons dependentes de ATP, específicas para  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , que permitem a passagem de íons específicos e, portanto, carga elétrica (CATTERALL, 1984; JENTSCH et al., 2004).

Assim como outros tipos de proteínas, os canais iônicos apresentam partes móveis que executam funções diferentes. Primariamente, essas proteínas possuem um poro aquoso e seletivo de íons que atravessa a membrana plasmática. Existem diferentes mecanismos para abrir, fechar ou inativar este poro, em resposta a diferentes estímulos biológicos, como alteração na tensão da membrana, interação de um ligante ou modificações pós-traducionais, como a fosforilação (YELLEN, 1998; JENTSCH et al., 2004). Essas mudanças permitem a rápida entrada ou saída de íons específicos em favor de seu gradiente eletroquímico, resultando na hiperpolarização ou despolarização da membrana (CATTERALL, 1984). A capacidade de modulação de canais específicos por determinados tipos de toxinas animais despertou grande interesse científico, visando a caracterização dessas proteínas, uma vez que elas podem ser consideradas como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos com potencial uso terapêutico (LEWIS e GARCIA, 2003; WULFF et al., 2009; COLOGNA et al., 2012).

Neste contexto, toxinas animais desempenharam um papel importante no estudo de canais iônicos, desde o início dos trabalhos sobre os princípios básicos que regem seu funcionamento (KOZLOV, 2017). Tipicamente, as toxinas podem interferir no funcionamento de canais iônicos dependentes de voltagem através de dois mecanismos distintos: **(1)** bloqueio da região do poro do canal, inibindo o fluxo de íons por ligação à parte externa ou no interior do poro condutor de íons; **(2)** modulação de abertura do poro, interagindo em um sítio específico da estrutura, alterando sua conformação durante a abertura ou inativação (KALIA et al., 2015).

Grande parte do conhecimento gerado sobre as propriedades de canais iônicos em membranas plasmáticas foram obtidos utilizando a técnica de “*voltage clamp*”. Em termos gerais, este método permite a leitura do fluxo de íons em uma membrana na forma de corrente elétrica, enquanto o potencial da membrana é mantido sob controle experimental com um amplificador de realimentação. Este método foi primeiramente desenvolvido por Cole (COLE, 1949) e Hodgking e colaboradores (HODGKIN et al., 1952), para uso em axônio gigante de lulas. Desde então, diferentes desdobramentos desta técnica foram desenvolvidos e a sua aplicação foi estendida para uma grande gama de tecidos e culturas celulares.

### 1.3.1. Canais para sódio dependentes de voltagem

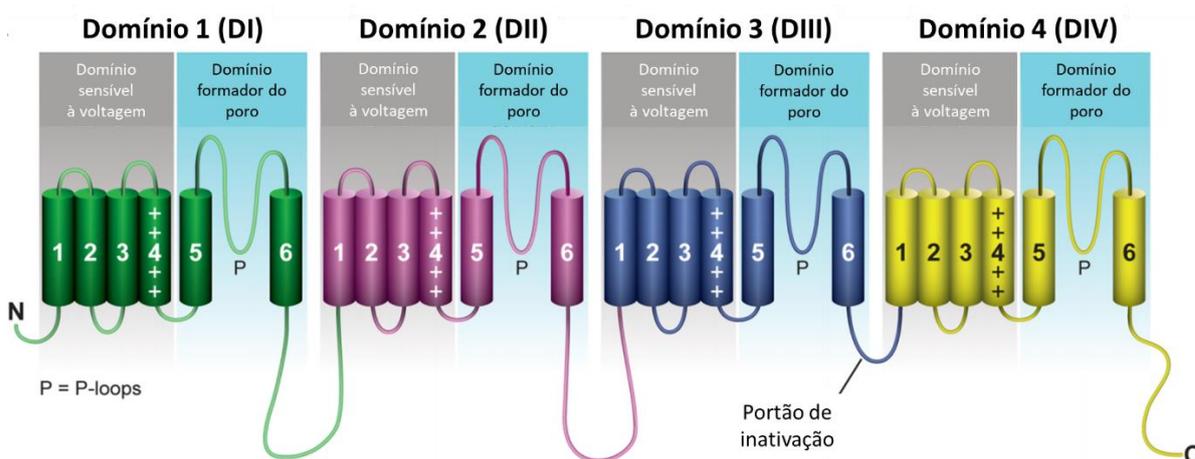
Os canais para sódio dependentes de voltagem (Navs) foram descobertos por Hodgkin e Huxley em 1952, durante estudos de condução elétrica em axônios de lulas gigantes (HODGKIN e HUXLEY, 1952). Tais estruturas compreendem proteínas transmembrana responsáveis pelo aumento, dependente de voltagem, na permeabilidade do sódio celular, iniciando potenciais de ação em células excitáveis (CLAIRFEUILLE et al., 2016; CARNEVALE e KLEIN, 2017). Seu papel na transmissão de impulsos nervosos é tão importante que seu aparecimento é considerado como um dos fatores-chave que sustentaram o desenvolvimento do sistema nervoso (KASIMOVA et al., 2016). Até o momento, nove isoformas destes canais foram identificadas em células de mamíferos, nomeadas de Nav1.1 a Nav1.9, apresentando mais de 50% de identidade entre suas sequências de aminoácidos. Recentemente, foi descoberta uma nova família de canais, denominada Nav2. Entretanto, pouco se sabe, até o momento, sobre suas funções no organismo (WATANABE et al., 2000; FUX et al., 2018).

As isoformas de Nav são diferenciadas pela sua localização no sistema nervoso e também pelos seus padrões de expressão em diferentes tecidos (GOLDIN, 2001; LUIZ e WOOD, 2016; ZAKLYAZMINSKAYA e DZEMESHKEVICH, 2016). As isoformas Nav1.1, 1.2 e 1.3 são expressas no sistema nervoso central (SNC), enquanto Nav1.4 e 1.5 são abundantes na musculatura cardíaca e esquelética, respectivamente. A isoforma Nav1.6 é expressa no SNC e no sistema nervoso periférico (SNP), ao passo que Nav1.7, 1.8 e 1.9 tem sua expressão majoritariamente restrita no SNP (DE LERA RUIZ e KRAUS, 2015).

Além de sua presença em células excitáveis, vários subtipos de Navs são expressos em células não excitáveis, como macrófagos, células cancerígenas, astrócitos e microglia. Eles podem desempenhar papéis diferentes nestes tipos de células, como a regulação de sua motilidade, liberação de moléculas bioativas, atividade de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, fagocitose e atividade metastática (DEUIS et al., 2017). Deste modo, essas características os transformam em importantes alvos moleculares, buscando o desenvolvimento de novas terapias para controlar determinadas condições patológicas (LIU et al., 2019).

Estruturalmente, os Navs consistem em um poro aquoso, formado por uma subunidade alfa, com aproximadamente 250 kDa, que pode ser associada a subunidades beta auxiliares ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 ou  $\beta$ 3) (CATTERALL, 2000). A subunidade alfa é composta por quatro domínios homólogos ligados covalentemente (I-IV), com seis segmentos transmembrana cada (S1-S6).

O segmento S4 é carregado positivamente, apresentando resíduos de lisina, arginina e histidina, atuando como um sensor de tensão para a ativação do canal (Fig. 8). A inativação é mediada por uma alça intracelular que conecta os domínios III e IV (CESTELE e CATTERALL, 2000). São conhecidos seis sítios diferentes que atuam como receptores nestas estruturas. As interações de toxinas com estes sítios específicos podem causar alterações importantes nas funções desempenhadas por esses canais em determinado processo fisiológico (STEVENS et al., 2011).



**Figura 8. Topologia das subunidades  $\alpha$  do canal Nav humano.** Essas proteínas consistem em quatro domínios homólogos DI (verde), DII (rosa), DIII (azul) e DIV (amarelo) conectados por alças intracelulares. Cada domínio contém seis segmentos helicoidais transmembranares (S1–S6). Os segmentos S1–S4 formam o domínio sensível à voltagem (VSD, *voltage sensor domain*). Os sinais positivos em S4 representam o domínio sensível à voltagem com carga positiva (contendo resíduos de lisina, arginina e histidina). O movimento do segmento S6 leva à abertura do canal em resposta à despolarização da membrana. Os segmentos S5, S6 e os poros-loops de conexão (loops-P) formam o poro do canal. O *loop* intracelular que liga DIIIS6 e DIVS1 funciona como uma porta de inativação, fechando o poro do canal durante a inativação rápida. Adaptado de Ruiz e Kraus (2015).

Os canais para sódio dependentes de voltagem são alvos moleculares para uma ampla gama de neurotoxinas, como a tetrodotoxina (TTX), saxitoxina (STX) e batracotoxina (BTX), assim como peptídeos isolados das peçonhas de escorpiões, aranhas, anêmonas do mar e caracóis. Essas toxinas interagem com pelo menos seis sítios já caracterizados em canais iônicos, denominados de 1 a 6, e podem inibir diretamente o poro do canal ou modular os seus mecanismos de abertura e fechamento (CESTELE e CATTERALL, 2000).

O alto grau de homologia entre as sequências de aminoácidos das diferentes isoformas de Navs dificulta o processo de busca de ligantes que sejam seletivos para um subtipo

específico. Todos os subtipos de Navs caracterizados até o momento podem ser classificados quanto à sua sensibilidade à neurotoxina TTX. As isoformas Nav1.1-1.4, Nav1.6 e Nav1.7 são inibidas por concentrações na faixa de nanomolar de TTX, sendo classificadas como sensíveis à TTX. Por outro lado, as isoformas Nav1.5, Nav1.8 e Nav1.9 são inibidas por concentrações na faixa de micromolar de TTX, classificadas, assim, como resistentes à TTX (DE LERA RUIZ e KRAUS, 2015).

Devido a extensas pesquisas e descobertas importantes no contexto dos Navs, compreendendo sua caracterização estrutural e funcional, sabe-se que estas estruturas estão envolvidas em uma variedade de distúrbios e patologias, como dor, desordens neuromusculares, epilepsia, doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, disfunção cognitiva, entre outros (CATTERALL et al., 2020). Notavelmente, processos patofisiológicos ligados à dor emergiram como uma indicação terapêutica promissora para os inibidores de Navs, com destaque para o Nav1.7 para o tratamento de dor crônica (GASKIN e RICHARD, 2012; WULFF et al., 2019). Entretanto, são necessários grandes investimentos na área de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos seletivos para determinadas isoformas destas estruturas, a fim de desenvolver terapias inovadoras para doenças e distúrbios específicos.

### **1.3.2. Canais para potássio dependentes de voltagem**

O fluxo de íons de potássio ( $K^+$ ) através de membranas celulares é um processo fisiológico essencial para diversas funções biológicas, como regulação da pressão arterial, imunidade, liberação de neurotransmissores e condução nervosa, contração muscular, secreção de hormônios, regulação do volume intracelular, crescimento e diferenciação celular, entre outros (MOUHAT et al., 2008; WULFF et al., 2009). Atualmente, sabe-se que o genoma humano codifica aproximadamente 40 genes de canais para potássio dependentes de voltagem (Kvs). Desta maneira, estes canais tornam-se alvos interessantes para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de diversos distúrbios, como câncer, doenças autoimunes, além de anomalias metabólicas, neurológicas e cardiovasculares (NORTON e CHANDY, 2017).

Esses canais são distribuídos em 12 subfamílias, denominadas Kv1 a Kv12, de acordo com a homologia de sua sequência de aminoácidos (GUTMAN et al., 2005). Essas subfamílias compartilham similaridades estruturais, apresentando tetrâmetros de subunidades alfa, que se juntam para formar complexos homo ou heterodiméricos. Cada subunidade alfa apresenta seis

segmentos transmembrana, denominados S1 a S6, e uma alça altamente conservada (P), situada entre os segmentos S5 e S6 (CATTERALL et al., 2007).

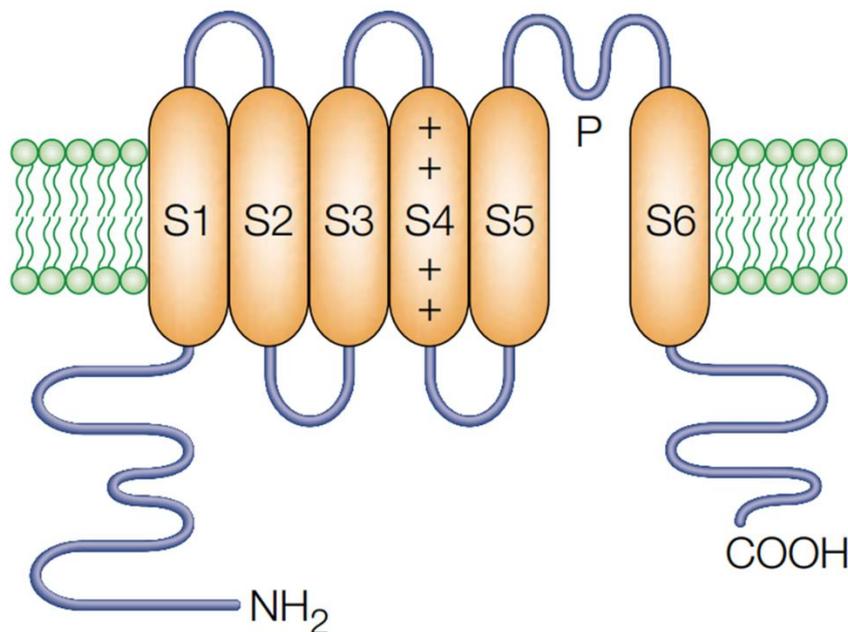
Todos esses canais estão distribuídos ao longo do organismo humano, variando sua expressão de acordo com sua localização. Membros da família dos canais Kv1.x (*Shaker*) são encontrados no cérebro (Kv1.1-1.4, Kv1.6 e Kv1.8), sistema nervoso (Kv1.1, Kv1.2 e Kv1.4-1.8), músculo esquelético (Kv1.1, Kv1.4, Kv1.7 e Kv1.8), musculatura lisa (Kv1.2 e Kv1.5), pâncreas (Kv1.1-1.3), pulmão (Kv1.3-1.7), placenta (Kv1.7), rim (Kv1.5 e Kv1.8), retina (Kv1.1 e Kv1.2), cólon (Kv1.5 e Kv1.6), assim como células hematopoiéticas, linfócitos e osteoclastos (Kv1.3) (HUMPHRIES e DART, 2015).

A família *Shab* compreende os Kv2.1 e Kv2.2, presentes no cérebro, coração, rim, musculatura esquelética, pulmão, retina e pâncreas. A família *Shaw* é composta pelos Kv3.1-3.4. Todas as isoformas desta família são encontradas no cérebro, embora algumas também estejam presentes na musculatura esquelética (Kv3.1 e Kv3.4), pâncreas (Kv3.2 e Kv3.4), fígado (Kv3.3), baço e linfócitos (Kv3.1) (RUDY e MCBAIN, 2001). A família *Shal*, representada pelos canais Kv4.1-4.3, é essencialmente encontrada no cérebro, coração, musculatura lisa e neurônios. Os canais do tipo KQT compreendem os Kv7.1-7.5. São majoritariamente encontrados no coração, pâncreas, sistema auditivo, rim, pulmão, cólon e placenta (Kv7.1), gânglios simpáticos e cérebro (Kv7.2) e cérebro, testículos e olhos (Kv7.3). O Kv7.4 é encontrado no sistema auditivo, enquanto o Kv7.5 é expresso no cérebro, gânglios simpáticos e musculatura esquelética (MOUHAT et al., 2008). Por fim, temos a família EAG (*ether-a-go-go*), composta pelos Kv10.x, Kv11.x e Kv12.x, discutidos em detalhes no item 1.3.3.

Canais para potássio desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento de diversas patologias humanas. Mutações em genes que codificam tais estruturas levam a distúrbios no SNC e SNP, sistema cardíaco, imune, circulatório, etc. (TIAN et al., 2014). Pesquisas recentes relacionam diversas patologias com o mal funcionamento destas estruturas, como ataxias episódicas, convulsões no período neonatal, doença de Alzheimer e Parkinson, síndrome de QT longo congênita, diabetes tipo II, entre outros (SHIEH et al., 2000).

Em termos de caracterização funcional, esses canais apresentam dois domínios distintos: **(1)** um sítio sensível à voltagem, compreendendo os segmentos transmembrana S1 a S4, o qual contém aminoácidos carregados positivamente e **(2)** um sítio condutor do poro, formado pelos segmentos S5 e S6, além do *loop* P (Fig. 9) (CATTERALL, 1995; CHOE, 2002). O modelo proposto para elucidar os mecanismos de abertura e fechamento destes canais considera que o

domínio C-terminal do segmento S3 e o segmento S4 formam um arranjo “*paddle-like*”, responsável pelos movimentos de abertura e fechamento destas estruturas (DOYLE et al., 1998).

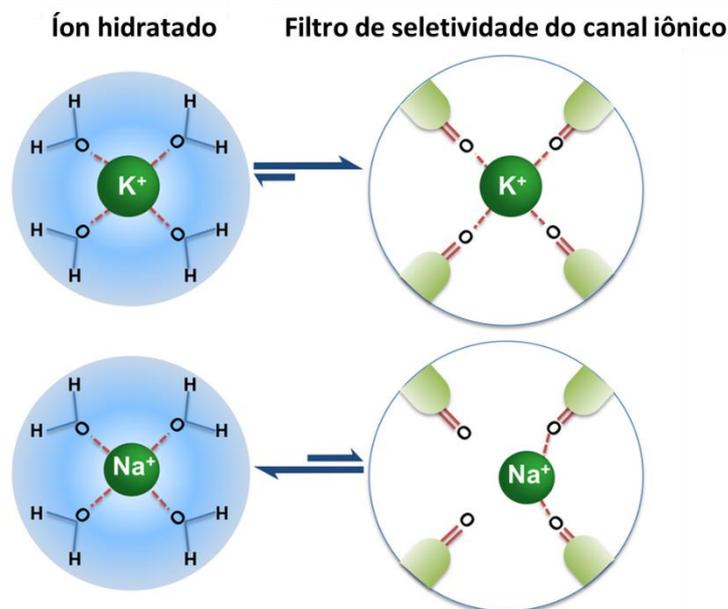


**Figura 9. Estrutura genérica de um canal para potássio sensível à voltagem.** As estruturas marcadas em laranja demonstram o domínio transmembrana da proteína, enquanto os segmentos em azul ilustram outras regiões do canal iônico. Os sinais positivos em S4 representam o domínio sensível à voltagem com carga positiva. Reproduzido de Choe, 2002.

Os canais para potássio são altamente permeáveis a esses íons devido ao filtro de seletividade presente na região do poro. Esta é a parte mais estreita do canal e possui uma sequência de aminoácidos altamente conservada: TVGYGD (BERNECHE e ROUX, 2005). Os íons de potássio só podem passar por esse filtro quando liberam moléculas de água da sua camada de solvatação, o que resulta em perda de energia. Os íons compensam essa perda energética ligando-se aos grupos carbonila da tirosina e glicina presentes no filtro de seletividade (Fig. 10). Somente no momento em que essa interação compensa a perda de energia que ocorreu quando as moléculas de água foram removidas, o íon potássio passa através do canal (KUANG et al., 2015).

O raio de um íon sódio apresenta menor tamanho quando comparado a um íon de potássio. Devido ao tamanho menor, a interação entre o sódio e o filtro de seletividade é menos favorecida (Fig. 10), não compensando a energia perdida pela liberação das moléculas de água (KUANG et al., 2015). Conseqüentemente, não é vantajoso energeticamente que um íon de

sódio passe através de um canal para potássio. Isso torna o canal de potássio 10.000 vezes mais permeável para os íons  $K^+$  do que para os íons  $Na^+$  (BERNECHE e ROUX, 2005).



**Figura 10. Interação dos íons potássio e sódio com grupos carbonila ou carboxila no filtro de seletividade de um canal para potássio.** Devido ao tamanho menor do íon sódio, a interação é subótima, o que torna o canal mais permeável aos íons potássio. Adaptado de Stravos et al. (2014).

Após os íons potássio se ligarem aos grupos carbonila no filtro de seletividade, eles precisam se dissociar desse local de ligação para que possam atravessar o canal. Essa dissociação ocorre pois os íons potássio começam a se repelir, através de forças eletrostáticas. Existem três locais de ligação para íons potássio no poro, localizados próximos um do outro. Devido à repulsão eletrostática, os íons deixam seu local de ligação e passam pela região dos poros (BERNECHE e ROUX, 2005).

Toxinas capazes de agir em Kvs geralmente se ligam na região do poro ou no domínio sensível à voltagem. As toxinas bloqueadoras e moduladoras de canais para potássio tiveram um importante papel no estudo destas estruturas, uma vez que permitiram a identificação e caracterização de novas subclasses de canais, além de auxiliarem no estudo da estequiometria das subunidades que formam tais estruturas (KALIA et al., 2015). A maioria das toxinas conhecidas atuantes nos canais para potássio dependentes de voltagem é encontrada nas peçonhas de escorpiões, aranhas e anêmonas. Por outro lado, as toxinas de peçonhas de serpente ainda são pouco estudadas quanto ao seu potencial de ação em canais iônicos.

### 1.3.3. Collineina-1 e o canal para potássio hEAG1

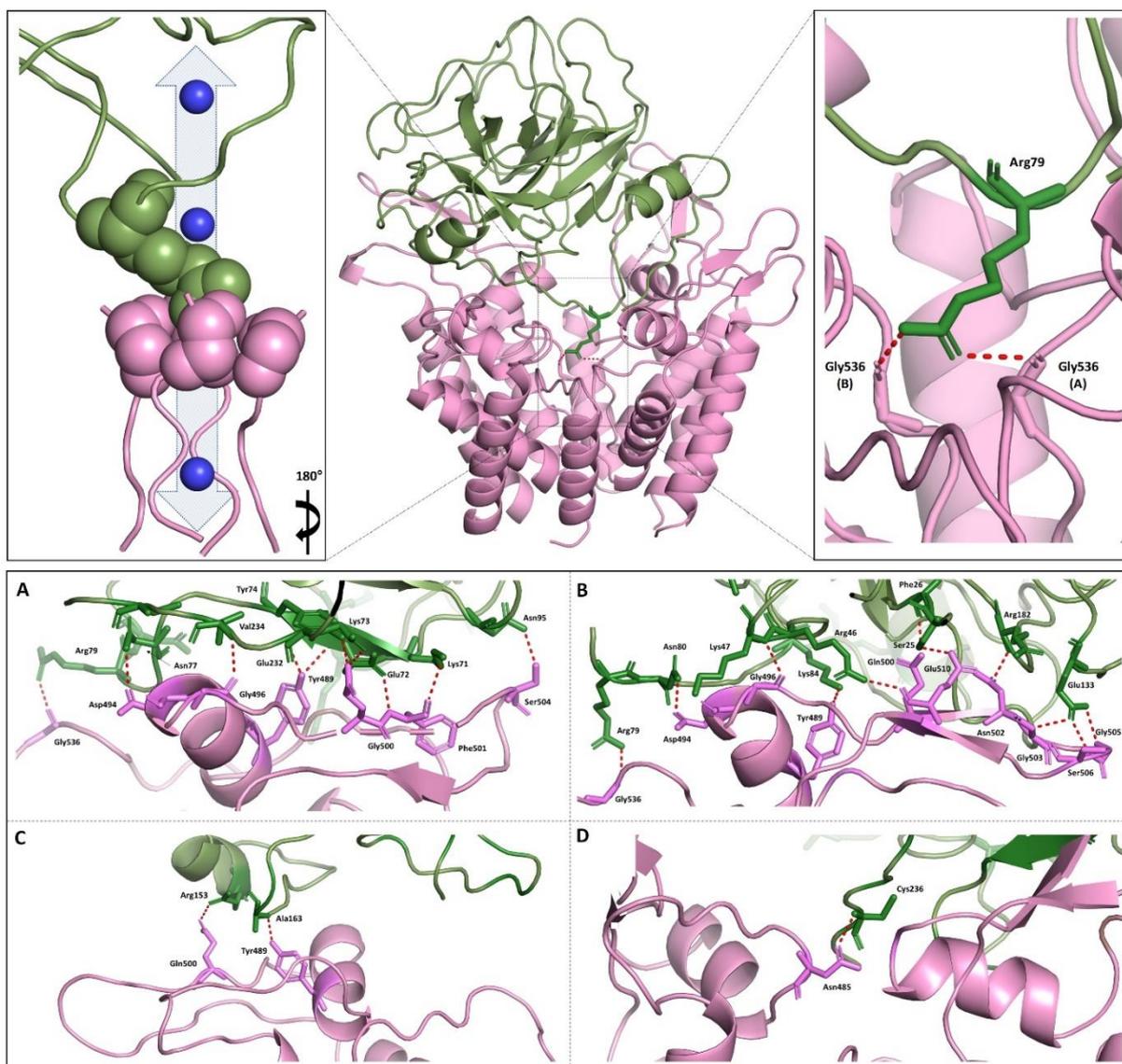
A família de canais para potássio dependentes de voltagem denominada *ether-à-go-go* compreende as subfamílias EAG (Kv10), gene relacionado à EAG (ERG, Kv11) e EAG-símile (ELK, Kv12), e são codificadas pela família de genes KCNH. A conformação tridimensional do canal EAG1 (WHICHER e MACKINNON, 2016) e do ERG1 (WANG e MACKINNON, 2017) foram publicadas recentemente. Estas caracterizações mostraram novas percepções sobre os seus diferentes domínios estruturais e evidenciaram diferenças funcionais em relação à família dos canais *Shaker*-símile (Kv1.x a Kv4.x) (BAUER e SCHWARZ, 2018).

Assim como todos os canais para potássio dependentes de voltagem, os canais EAG são compostos por quatro subunidades, com seis segmentos transmembrana cada (S1-S6), que formam o domínio sensível à voltagem (VSD, *voltage sensor domain*), nos segmentos S1 a S4, e o domínio do poro, que compreende os domínios S5 e S6. Quando comparados aos canais *Shaker*-símile, os canais da família EAG exibem algumas diferenças em suas características. O seu filtro de seletividade apresenta uma sequência própria desta família (TVGFNG), ao invés da sequência clássica de Kvs (TVGYGD). Entretanto, esta diferença aparenta não ter influência nas dimensões do filtro de seletividade e, portanto, não altera a seletividade destes canais ao potássio (WANG e MACKINNON, 2017).

Nos canais do tipo *Shaker*, a ligação dos domínios S4-S5 é uma longa hélice composta por 15 resíduos. Acredita-se que esta hélice funcione como uma espécie de alavanca, transferindo os movimentos do domínio sensível à voltagem para o portão de ativação do canal. Esta estrutura está localizada no domínio do poro das subunidades vizinhas, característica denominada “*domain swapped*” (LONG et al., 2005). Por outro lado, os canais da família EAG não apresentam o motivo PRO-x-PRO no segmento S6 e a ligação dos domínios S4-S5 é um pequeno *loop* não helicoidal, constituído por cinco resíduos que, por conta do seu tamanho reduzido, não são do tipo “*domain swapped*” (LORINCZI et al., 2015).

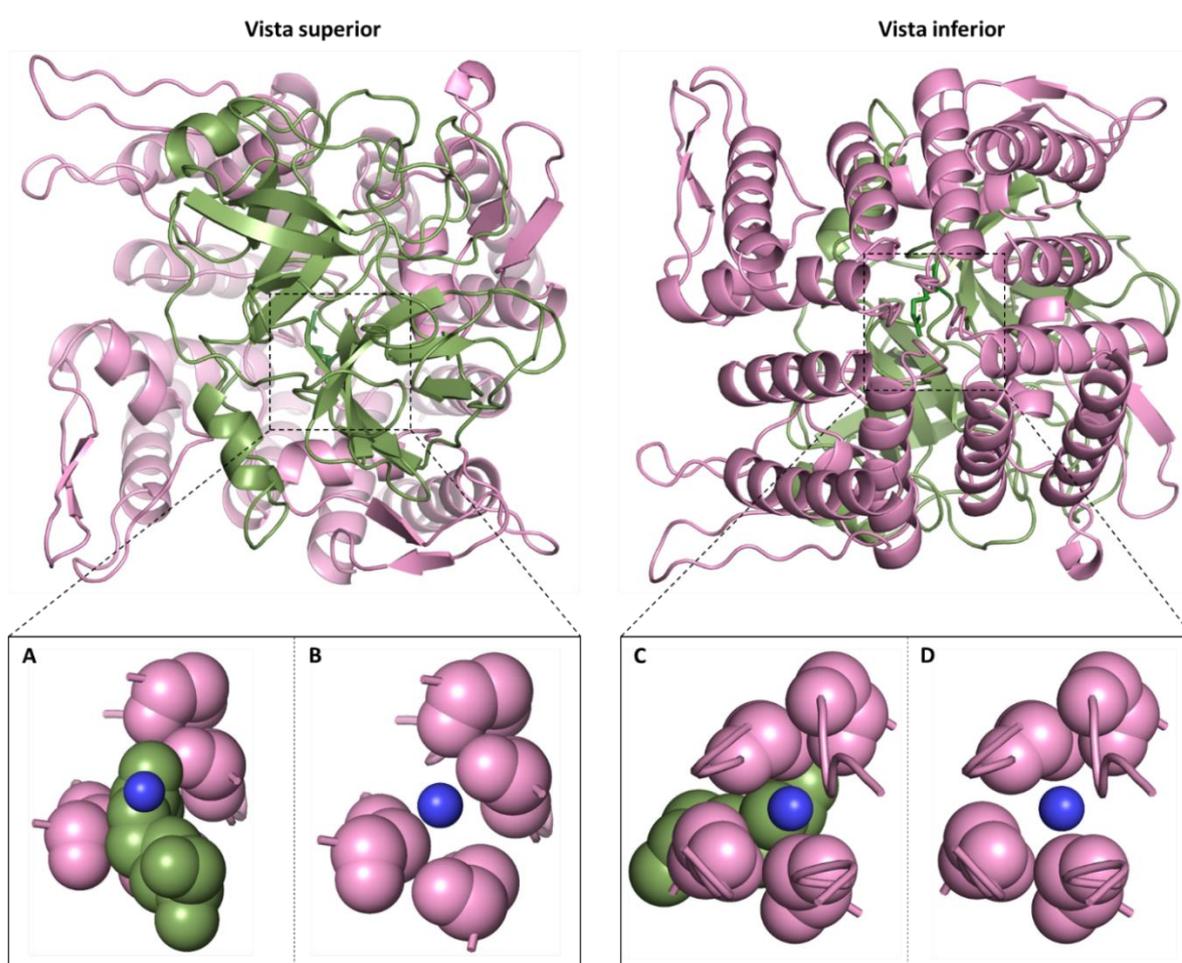
Recentemente foi relatado que algumas SVSPs, particularmente a collineina-1, são capazes de inibir o canal para potássio hEAG1. Estudos de mutação sítio-dirigida foram conduzidos e mostraram que a inibição deste canal iônico é independente da sua atividade enzimática. Através de estudos de modelagem e *docking* molecular, sugeriu-se que a collineina-1 ancora-se no hEAG1, de modo reversível, através de diversas interações com diferentes resíduos de aminoácidos do canal. No total, 20 resíduos da collineina-1 fazem ligações de hidrogênio com 23 resíduos de diferentes subunidades do canal, além de 17 interações

hidrofóbicas, (Fig. 11), revelando uma forte interface de interação entre as estruturas. Esta interação é evidenciada pelos baixos valores de  $IC_{50}$  apresentados pela collineina-1 nativa ( $4,2 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ), recombinante ( $2,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$ ) e mutante ( $4,3 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ) (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2020).



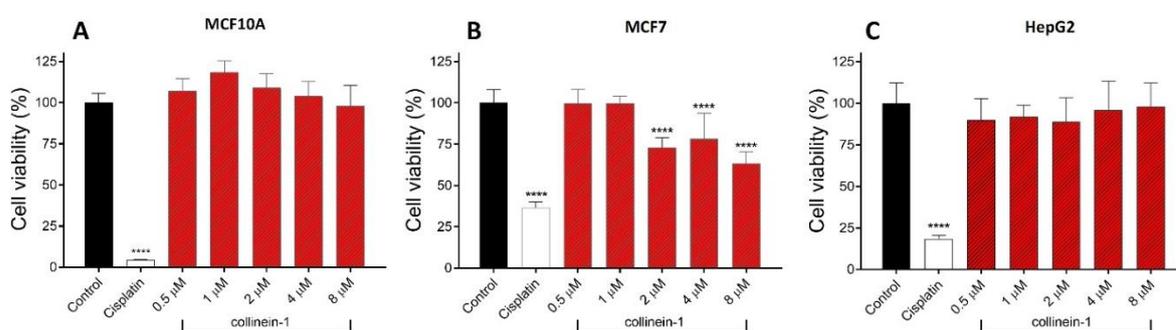
**Figura 11. Docking molecular entre a collineina-1 e o canal iônico hEAG1.** Visualização lateral das estruturas, validada por ensaios de dinâmica molecular. O painel ampliado à esquerda mostra o bloqueio do poro condutor de íons do canal pelo resíduo R79 da collineina-1, enquanto o da direita destaca as ligações de hidrogênio entre o resíduo R79 da collineina-1 e os resíduos de Glicina 536 das subunidades ‘A’ e ‘B’ do canal iônico. Os painéis de (A) a (D) enfatizam as interfaces de interação entre a collineina-1 e as diferentes subunidades do hEAG1. Imagem elaborada pelo autor.

O *docking* molecular proposto revelou um farmacóforo que compreende um resíduo de arginina (R79) na estrutura da collineína-1, cuja cadeia lateral faz ligações de hidrogênio com os resíduos de glicina (G536) de duas subunidades do canal iônico. O resíduo R79 projeta-se do loop 99 da collineína-1, que circunda a entrada do sítio ativo da enzima. Através desta interação, há uma obstrução do poro do hEAG1, impedindo a passagem de íons (Fig. 12). O modelo proposto de bloqueio do poro do canal corrobora os dados eletrofisiológicos obtidos, os quais mostraram que não há um desvio significativo da curva de ativação dependente de voltagem do canal.



**Figura 12. Vista superior e inferior do *docking* molecular proposto entre a collineína-1 e o hEAG1.** Os painéis ampliados de cada estrutura mostram o bloqueio do filtro de seletividade do hEAG1 pelo resíduo R79 da collineína-1. Os painéis A e B representam, em uma vista superior, o filtro de seletividade na presença e na ausência de collineína-1, respectivamente. Os painéis C e D representam, em uma vista inferior, o filtro de seletividade na presença e na ausência de collineína-1, respectivamente. A collineína-1 é representada pela estrutura em verde e o canal hEAG1 é representado pela estrutura em rosa. O íon de potássio é representado como uma esfera azul. Imagem elaborada pelo autor.

No contexto do potencial antitumoral da collineina-1, foi avaliada a dose-resposta de citotoxicidade em duas linhagens celulares cancerígenas (hepatocarcinoma celular, HepG2, e adenocarcinoma mamário, MCF7) e uma linhagem não tumoral (célula epitelial mamária, MCF10A) (Fig. 13). A collineina-1 não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas para as linhagens celulares HepG2 e MCF10A. Por outro lado, na linhagem tumoral MCF7, as concentrações de 2 a 8  $\mu\text{M}$  reduziram, de modo significativo, a viabilidade celular, embora não tenha sido observado um padrão de dose-resposta nesta atividade.



**Fig. 13. Viabilidade celular das linhagens celulares MCF10A (A), MCF7 (B) e HepG2 (C), avaliada por MTT após o tratamento com diferentes concentrações de collineina-1.** Resultados expressos pela média  $\pm$  DP para três experimentos independentes ( $n = 3$ ). Controle negativo: PBS; controle positivo: cisplatina. (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ , em relação ao controle negativo (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey). Imagem elaborada pelo autor.

A superexpressão de canais pertencentes à superfamília EAG foi demonstrada em cerca de 80% dos cânceres de mama (WALLACE et al., 2011). Na linha celular tumoral MCF7, os canais hEAG1 estão envolvidos no aumento da proliferação e na progressão do ciclo celular (ROY et al., 2008). Por outro lado, a expressão de hEAG1 em células de carcinoma hepatocelular (HepG2) parece estar limitada aos estágios iniciais do desenvolvimento neoplásico, embora o papel preciso dos canais de hEAG1 nessa linha de tumor não foi completamente elucidado (CHAVEZ-LOPEZ et al., 2015). Uma vez que a collineina-1 foi capaz de reduzir a viabilidade das células tumorais MCF7, é possível sugerir que o efeito antitumoral da toxina possa estar relacionado à inibição dos canais hEAG1 nessa linha tumoral. No entanto, os mecanismos antitumorais da collineina-1, bem como seus efeitos na proliferação, apoptose e ciclo celular, ainda precisam ser investigados de forma mais abrangente.

Diversos estudos na literatura relataram a expressão exacerbada de canais iônicos pertencentes à família EAG, particularmente hEAG1 e hERG1, em diferentes células neoplásicas. Estes canais desempenham papéis fundamentais na progressão tumoral, envolvidos em mecanismos de controle de volume celular, proliferação, migração e apoptose (CAZARES-ORDONEZ e PARDO, 2017; HE et al., 2020). A superexpressão de hEAG1 e hERG1 em células cancerígenas tem aumentado o interesse da comunidade científica na possível aplicação destas estruturas como marcadores tumorais, fatores de prognóstico e/ou alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer.

#### **1.4. Expressão de toxinas animais em sistema heterólogo**

Os primeiros tratamentos biofarmacêuticos foram desenvolvidos no final do século 19, com a criação das primeiras vacinas e a proliferação de transfusões de sangue seguras e repetíveis. O início do século 20 foi marcado pela descoberta e aplicação de produtos como insulina, derivada de fontes animais; e penicilina, cuja produção em escala industrial foi desenvolvida durante a Segunda Guerra Mundial. A revolução biotecnológica redesenhou a pesquisa, desenvolvimento, produção e até mesmo o processo de marketing dos medicamentos. Novos e poderosos instrumentos científicos e tecnológicos relacionados à biotecnologia, genômica e proteômica, por exemplo, possibilitaram a descoberta e o estudo de proteínas e outras macromoléculas que anteriormente não era possível (STRYJEWSKA et al., 2013; LALOR et al., 2019; ZHANG et al., 2020).

A tecnologia de DNA recombinante (rDNA) reportada por Cohen e Boyer (COHEN et al., 1973; MORROW et al., 1974) permitiu a produção de uma variedade de peptídeos, proteínas e outras biomoléculas por células que, naturalmente, não sintetizariam tais compostos. Esta tecnologia, com aproximadamente 45 anos de idade, está se tornando uma das mais importantes ferramentas desenvolvidas no século 20 (STRYJEWSKA et al., 2013). Recentemente, o número de proteínas recombinantes utilizadas em aplicações terapêuticas aumentou consideravelmente. Muitas destas macromoléculas são complexas glicoproteínas e anticorpos, com elevada necessidade de produção. Esta demanda direcionou o aperfeiçoamento dos métodos de produção heteróloga de proteínas, particularmente envolvendo células de mamíferos e culturas de microrganismos (ANDERSEN e KRUMMEN, 2002).

O termo “biofármaco” compreende as proteínas recombinantes utilizadas em âmbito clínico, incluindo enzimas, anticorpos e produtos baseados em ácidos nucleicos. Atualmente,

proteínas e peptídeos são as classes predominantes de moléculas sob investigação ou em uso. Entretanto, este cenário tende a se modificar nos próximos anos, com as outras classes de moléculas ganhando similar importância (WALSH, 2010b).

Produtos farmacêuticos e enzimas industriais foram os primeiros produtos biotecnológicos a serem produzidos através do uso do DNA recombinante. Dentro deste contexto, a insulina recombinante foi o primeiro biofármaco aprovado para uso em humanos, produzida em *Escherichia coli*. Desde então, o mercado de proteínas e peptídeos recombinantes utilizados na terapêutica tem crescido rapidamente. Entre 8 a 12 medicamentos são aprovados, a cada ano, representando em torno de 25% de novas moléculas que entram no mercado (WALSH, 2014).

Diversos sistemas envolvendo células procarióticas e eucarióticas foram desenvolvidos, a fim de facilitar a produção de proteínas recombinantes. Por diferentes razões, econômicas, práticas e regulatórias, apenas alguns sistemas são empregados para a produção de biofármacos. Estes sistemas geralmente envolvem o uso da bactéria *E. coli*, diferentes espécies de fungos (*Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae*) e algumas linhagens celulares de mamíferos (BERLEC e STRUKELJ, 2013; BANDARANAYAKE e ALMO, 2014). A figura 14 ilustra os principais tipos de células utilizadas para a produção de proteínas recombinantes, com vantagens e desvantagens referentes a cada classe.

Apesar dos recentes avanços empregando rDNA em células de mamíferos, as leveduras permanecem como opções interessantes para a produção heteróloga de proteínas (WALSH, 2014; LOVE et al., 2018). Estes organismos são hospedeiros alternativos promissores para a fabricação de proteínas recombinantes, uma vez que atendem de forma simples e eficiente as necessidades tanto de medicamentos de larga escala de produção quanto aqueles de pequeno mercado. O rápido acúmulo de biomassa, aliado ao baixo custo de manutenção, reduz o valor dos medicamentos produzidos em leveduras, que por sua vez pode permitir processos de fabricação mais eficientes.



Bactérias

**Principais vantagens:**

- Meio rápido de expressão
- Método barato
- Fácil *scale-up* de produção

**Principais desvantagens:**

- Ausência de modificações pós-traducionais;
- Dificuldade de produção de proteínas em conformação funcional.



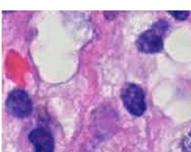
Leveduras

**Principais vantagens:**

- Meio rápido de expressão
- Realiza modificações pós-traducionais

**Principais desvantagens:**

- Padrões de glicosilação diferentes daqueles encontrados em humanos



Células de mamíferos

**Principais vantagens:**

- Realiza modificações pós-traducionais semelhante aos humanos

**Principais desvantagens:**

- Expansão celular lenta
- Método oneroso de produção
- Dificuldade de *scale up* na produção

**Figura 14. Principais meios de produção de proteínas recombinantes utilizadas atualmente.** Cada classe é representada com as suas principais vantagens e desvantagens para a produção de biofármacos. Imagem elaborada pelo autor.

A levedura metilotrófica *P. pastoris* tem sido utilizada há décadas como fábrica biológica de proteínas recombinantes (JUTURU e WU, 2018; KARBALAEI et al., 2020). Suas principais vantagens estão associadas à fácil manipulação genética, gerando linhagens celulares estáveis, e alto crescimento em meios de cultura, quando comparadas àquelas apresentadas por células de mamíferos, por exemplo (LOVE et al., 2018).

Além disso, os vetores de expressão são facilmente preparados e podem favorecer a incorporação de múltiplas cópias da proteína de interesse, além de permitir a produção de proteínas multiméricas com diferentes subunidades. Outra vantagem está relacionada ao uso de promotores específicos que direcionam a maquinaria celular para a produção da proteína recombinante (GASSER e MATTANOVICH, 2018). Assim, há um favorecimento da produção de grandes quantidades do produto, além de ser uma técnica relativamente simples e barata, quando comparada a outros tipos de sistemas de expressão heteróloga em células eucarióticas (AMORIM et al., 2018). Por fim, estes organismos combinam as vantagens de organismos unicelulares, como a facilidade da manipulação genética e rápido crescimento, com a habilidade de executar modificações pós-traducionais, mecanismo existente somente em organismos eucariotos (CELIK e CALIK, 2012).

A escolha do sistema de expressão heteróloga adequado é uma das partes fundamentais durante o processo de desenvolvimento de um novo biofármaco. Embora detalhes envolvendo

processos patentários e aspectos econômicos sejam importantes nesta tomada de decisão, é fundamental considerar, nesta escolha, o sistema mais adequado e eficiente para a produção da molécula recombinante (WALSH, 2010b).

Apesar de as toxinas encontradas nas peçonhas de serpentes apresentarem um grande potencial de aplicabilidade biotecnológica e terapêutica (MUNAWAR et al., 2018; PEIGNEUR e TYTGAT, 2018; BORDON et al., 2020), a pequena quantidade obtida destas proteínas, por meio da extração da peçonha, muitas vezes impossibilita sua aplicação terapêutica ou biotecnológica (BOLDRINI-FRANCA et al., 2017). Deste modo, a expressão heteróloga de toxinas tem se mostrado um método efetivo na obtenção destas macromoléculas, possibilitando, assim, sua caracterização funcional e estrutural, passo fundamental para a sua aplicação em diversas áreas (AMORIM et al., 2018).

SVSPs de diferentes serpentes já foram expressas em sistemas heterólogos, utilizando leveduras: *Trimeresurus albolabris* (PRADNIWAT e ROJNUCKARIN, 2015), *Bothrops atrox* (LI et al., 2007), *Gloydius shedaoensis* (YANG et al., 2009), *Agkistrodon caliginosus* (YUAN et al., 2009), *Agkistrodon rhodostoma* (ZHANG et al., 2011), *Crotalus durissus collilineatus* (BOLDRINI-FRANCA et al., 2015), e *Bothrops pauloensis* (ISABEL et al., 2016). Ademais, já foi relatada a expressão de uma SVSP da serpente *C. d. terrificus* em células de mamíferos (YONAMINE et al., 2009), e também de duas SVSPs, de *Cerastes cerastes* (DEKHIL et al., 2003) e *Deinagkistrodon Acutus* (LI et al., 2018), em *E. coli*. Entretanto, não há relatos da PEGlação de SVSPs recombinantes, buscando sua aplicação biotecnológica ou terapêutica.

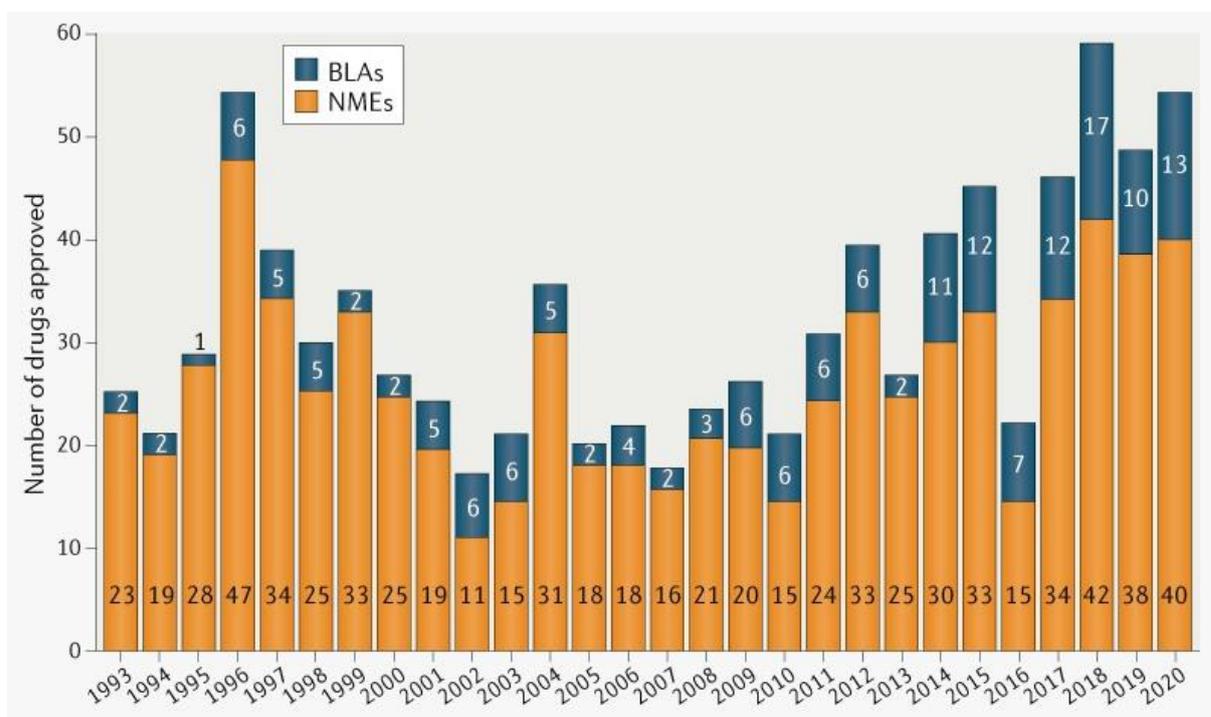
### 1.5. Produção, PEGlação e o mercado farmacêutico de proteínas recombinantes

Biofármacos são medicamentos derivados de proteínas e peptídeos obtidos, na maioria das vezes, em organismos geneticamente modificados, como bactérias, leveduras e células animais e vegetais (WOHLRAB, 2019). Estes medicamentos aumentaram a eficácia do tratamento de inúmeras patologias que trazem risco à vida ou que são de grau crônico em humanos, relacionados à hemostasia, tumores, doenças mediadas pelo sistema imune, como artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, lúpus eritematoso sistêmico e psoríase (WALSH, 2010a). Estas moléculas pertencem a várias classes de compostos, como hormônios, fatores de crescimento, anticorpos, enzimas, inibidores e vacinas (RYU et al., 2012).

Em 2020, 13 novos biofármacos foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration* – EUA) para uso humano (Fig. 15). Além destes, outros quatro biofármacos

foram aprovados pelo “*Center for Biologics Evaluation and Research*”, uma divisão do FDA responsável especialmente pelo licenciamento de novos biofármacos naquele país (MULLARD, 2021). Entre os recentes medicamentos aprovados, encontra-se o “Esperoct” (Novo Nordisk®, Dinamarca), composto pelo Fator VIII recombinante PEGlado, indicado no tratamento da hemofilia A (EZBAN et al., 2020).

Além dos biofármacos comercialmente disponíveis, muitos estão em períodos de testes clínicos ou pré-clínicos. Em 2015, cinco dos 15 medicamentos mais vendidos mundialmente eram derivados de proteínas ou peptídeos, e correspondiam por cerca de 25% do total de vendas. Os biofármacos alcançaram um valor de venda global de 174,7 bilhões de dólares naquele ano, com uma avaliação anual de crescimento de 7,3%, além estimativas de alcançarem 248,7 bilhões de dólares em 2020 (AGYEI et al., 2017).



**Figura 15. Total de novos medicamentos aprovados para uso humano, entre 1993 e 2020 pelo FDA.** Colunas em laranja: medicamento cujo princípio ativo são pequenas moléculas orgânicas ou inorgânicas; colunas em azul escuro: biofármacos. Fonte: MULLARD, 2021.

Atualmente, 20% do mercado farmacêutico é composto por biofármacos. Este mercado cresce duas vezes mais, a cada ano, quando comparado aos outros tipos de medicamentos (SAUNA et al., 2018). O uso de proteínas e peptídeos na terapêutica tem expandido nos últimos anos devido à: (1) descoberta de novas biomoléculas; (2) melhor entendimento de seus

mecanismos de ação *in vivo*; (3) avanços na expressão heteróloga ou síntese de proteínas e peptídeos com ação terapêutica e (4) aperfeiçoamentos nas formulações ou tecnologias de alterações moleculares que possuem a capacidade de distribuir polipeptídeos *in vivo* com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas melhoradas (ROBERTS et al., 2002). Em 2019, quatro em cada 10 medicamentos em desenvolvimento eram derivados de biotecnologia. A crescente demanda por medicamentos personalizados e medicamentos órfãos (*orphan drugs*) está impulsionando os investimentos em P&D em biofármacos.

Por outro lado, grande parte das proteínas de uso terapêutico apresenta algum grau de resposta humoral, devido à imunogenicidade intrínseca destas moléculas exógenas. A imunogenicidade é caracterizada pela presença de anticorpos contra determinado (bio)fármaco (ADAs – *Anti-drug antibodies*), detectados na circulação sanguínea após a administração do medicamento (GARCES e DEMENGEOT, 2018).

Os ADAs que se ligam ao sítio ativo da molécula e inibem a sua atividade são denominados de anticorpos neutralizantes. Os anticorpos não-neutralizantes são aqueles que não se ligam no sítio ativo, porém ainda podem produzir efeitos clínicos importantes, como redução da eficácia terapêutica, através do comprometimento da biodisponibilidade, por exemplo (BENDTZEN, 2012). A geração de ADAs, sendo eles neutralizantes ou não, cada vez mais é reconhecida como um mecanismo para explicar a redução ou ausência da eficácia de determinados medicamentos (PINEDA et al., 2016).

Esta resposta do sistema imunológico pode levar à perda da eficácia terapêutica, sua neutralização, ou ainda a efeitos adversos, como complicações semelhantes às aquelas apresentadas pela doença do soro, reações à perfusão e anafilaxia (SCHELLEKENS, 2002; 2005; WOLBINK et al., 2009). Desta maneira, um dos desafios da medicina moderna é o desenvolvimento de metodologias que reduzam a imunogenicidade dos biofármacos, de modo a aumentar sua eficácia terapêutica (BENDER et al., 2007; LALOR et al., 2019; VANDERLAAN et al., 2020).

A avaliação da imunogenicidade é uma das etapas principais no desenvolvimento de qualquer biofármaco, incluindo aqueles denominados biossimilares (GARCES e DEMENGEOT, 2018). Neste contexto, diversos fatores podem influenciar esta característica, os quais podem ser categorizados em três itens distintos. O primeiro deles, associado ao tratamento, envolve o mecanismo de ação do medicamento, via e frequência de administração e duração da terapia. Em segundo lugar, temos os fatores associados ao paciente, que compreendem o tipo de patologia por ele apresentado, a evolução da doença, a condição do

sistema imune, fatores genéticos, presença de patologias secundárias, medicamentos complementares em uso durante a terapia e exposição e/ou sensibilização prévia ao medicamento em uso. Por fim, os fatores associados ao medicamento incluem o sistema de expressão heteróloga utilizado para a produção do medicamento, modificações pós-traducionais presentes na proteína e a presença de impurezas, contaminantes e agregados na formulação (PINEDA et al., 2016).

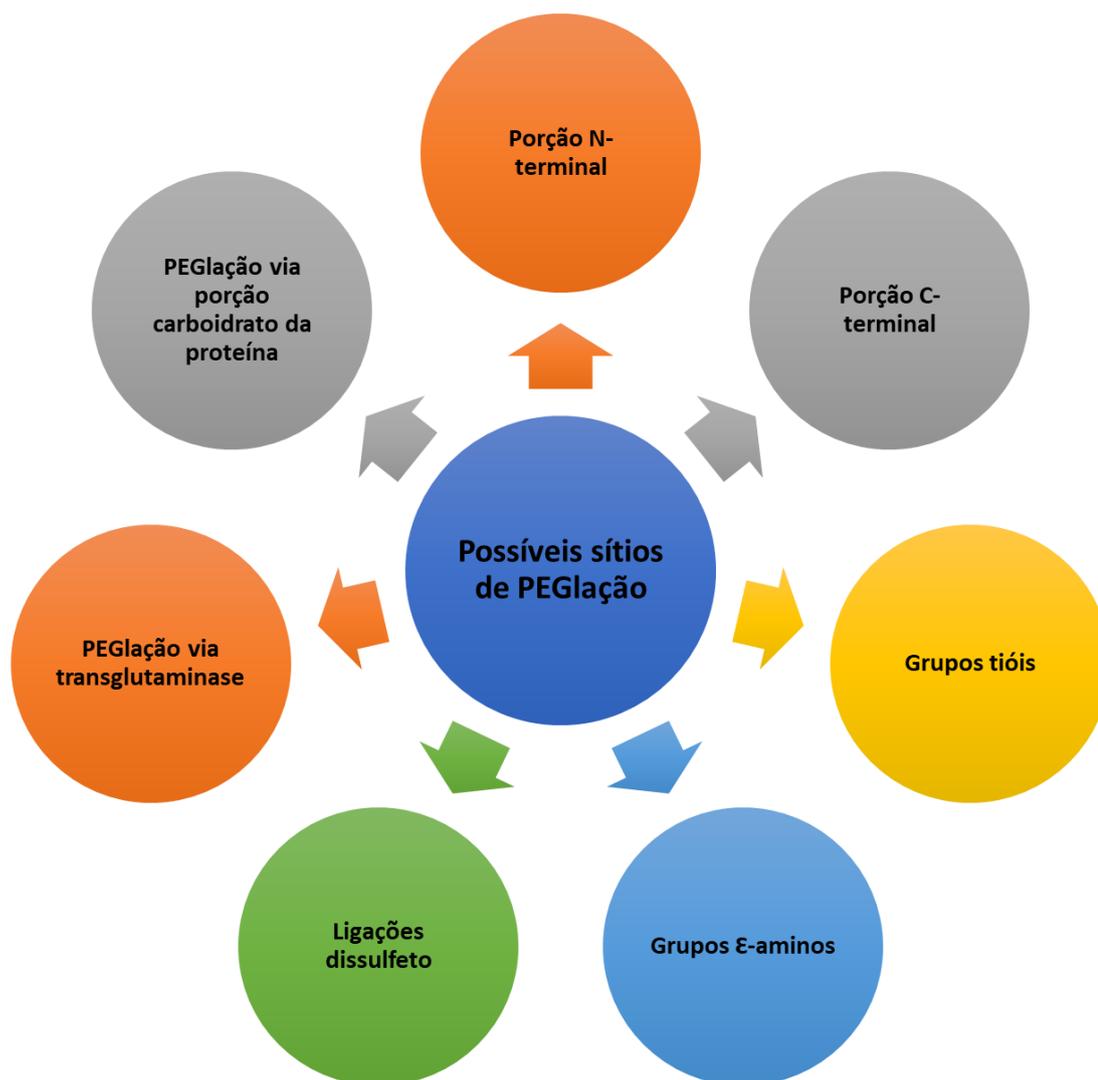
No contexto da modificação de produtos farmacêuticos, o termo PEGlação descreve a modificação de biomoléculas pela conjugação covalente com polietilenoglicol (PEG), um polímero não tóxico e não imunogênico, usado como estratégia para superar as desvantagens associadas aos biofármacos, apresentadas anteriormente (VERONESE e MERO, 2008; WAN, X. et al., 2017). A ligação covalente de PEG às proteínas é uma tecnologia bem estabelecida e largamente utilizada, cumprindo vários requisitos que visam a segurança e eficácia de medicamentos (FREITAS DDA e ABRAHAO-NETO, 2010; JEVSEVAR et al., 2010; HOANG THI et al., 2020; THAKOR et al., 2020).

A PEGlação pode modificar as propriedades físicas e químicas da biomolécula, como sua conformação, interações eletrostáticas e hidrofobicidade, resultando na melhora do comportamento farmacocinético do medicamento, além de outros benefícios (Fig. 16) (MAIER et al., 2019). Na sua forma mais comum, o polietilenoglicol é uma cadeia linear ou ramificada, terminada com grupos hidroxílicos, apresentando a estrutura geral  $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$  (ROBERTS et al., 2002). Este processo pode ocorrer em diferentes locais da proteína (SANTOS et al., 2018), dependendo do tipo de PEG utilizado e da aplicação desejada (Fig. 17).



**Figura 16. Benefícios da PEGlação de proteínas e peptídeos na aplicação destas moléculas na área terapêutica.** Imagem elaborada pelo autor.

De maneira geral, a PEGlação beneficia a solubilização destas moléculas, além de reduzir sua imunogenicidade. Adicionalmente, há também uma melhora na estabilidade da estrutura, bem como a redução do *clearance* total do biofármaco, diminuindo, desta forma, a frequência de administração do medicamento (GEFEN et al., 2013; FEREBEE et al., 2016; OZTURK-ATAR et al., 2018). A frequência de administração de medicamentos é uma das maiores limitações para a aplicação terapêutica de alguns fármacos, uma vez que pacientes tendem a apresentar baixa aderência ao tratamento com fármacos que requerem múltiplas administrações diárias (TAVARES et al., 2016).



**Figura 17. Possíveis sítios de PEGlação de proteínas e peptídeos.** A PEGlação destes compostos pode ocorrer em diferentes sítios, de acordo com o derivado de polietilenoglicol utilizado, efeito estérico e disposição dos grupos disponíveis para PEGlação na proteína de interesse. Imagem elaborada pelo autor.

Embora essa ferramenta de modificação molecular tenha sido largamente empregada na produção de biofármacos (Tab. 1), seu uso em toxinas permanece restrito, ainda que seja uma estratégia promissora para aumentar o uso terapêutico destas moléculas. Em relação às SVSPs, apenas uma toxina, em sua forma nativa, foi PEGlada com sucesso até o momento (DA-SILVA-FREITAS et al., 2015). A modificação desta SVSP pela conjugação ao PEG trouxe melhoras significativas, como o aumento da sua eficiência catalítica, bem como a diminuição do valor de  $K_m$  calculado.

**Tabela 1. Medicamentos PEGlados aprovados pelo FDA para uso em humanos**

<b>Nome comercial</b>	<b>Companhia farmacêutica</b>	<b>Sítio de PEGlção</b>	<b>Tamanho do PEG (kDa)</b>	<b>Indicação terapêutica</b>	<b>Ano de aprovação</b>
Adagen	Enzon	Lisina	5	Imunodeficiência combinada severa	1990
Oncaspar	Enzon	Lisina	5	Leucemia linfoblástica aguda	1994
PEG-INTRON	Schering-Plough	Histina, cisteína, lisina, serina e tirosina	12	Hepatite C	2000
PEGASYS	Hoffman-La Roche	Lisina	40	Hepatite C	2001
Neulasta	Amgen	N-terminal	20	Neutropenia	2002
Somavert	Pfizer	Lisinas, N-terminal	5	Acromegalia	2003
Macugen	Pfizer	Lisina	40	Degeneração macular ligada à idade	2004
Mircera	Hoffman-La Roche	Lisina	30	Anemia associada à falência renal crônica	2007
Cimzia	UCB	C-terminal	40	Doença de Crohn	2008
Krystexxa	Savient	Lisina	10	Gota crônica	2010
Sylatron	Merck	Histidina, cisteína, lisina, serina, tirosina	12	Melanoma	2011
Omontys	Affymax/Takeda	Lisina	40	Anemia associada com doença renal crônica	2012
Plegridy	Biogen	N-terminal	20	Esclerose múltipla	2014
Adynovate	Baxalta	Lisina	20	Hemofilia A	2015
Esperoct	Novo Nordisk	Glicosilação	40	Hemofilia A	2019

Deste modo, é notável o potencial que esta técnica de modificação molecular, aliada às atividades específicas das SVSPs, pode trazer para a aplicação terapêutica e biotecnológica destas toxinas. Sendo assim, nesta tese é descrita a PEGlação de uma serinoprotease da peçonha de *C. d. collilineatus*, produzida de maneira recombinante em sistema de expressão *Pichia pastoris*, visando sua futura aplicação terapêutica e/ou biotecnológica.

---

**OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais

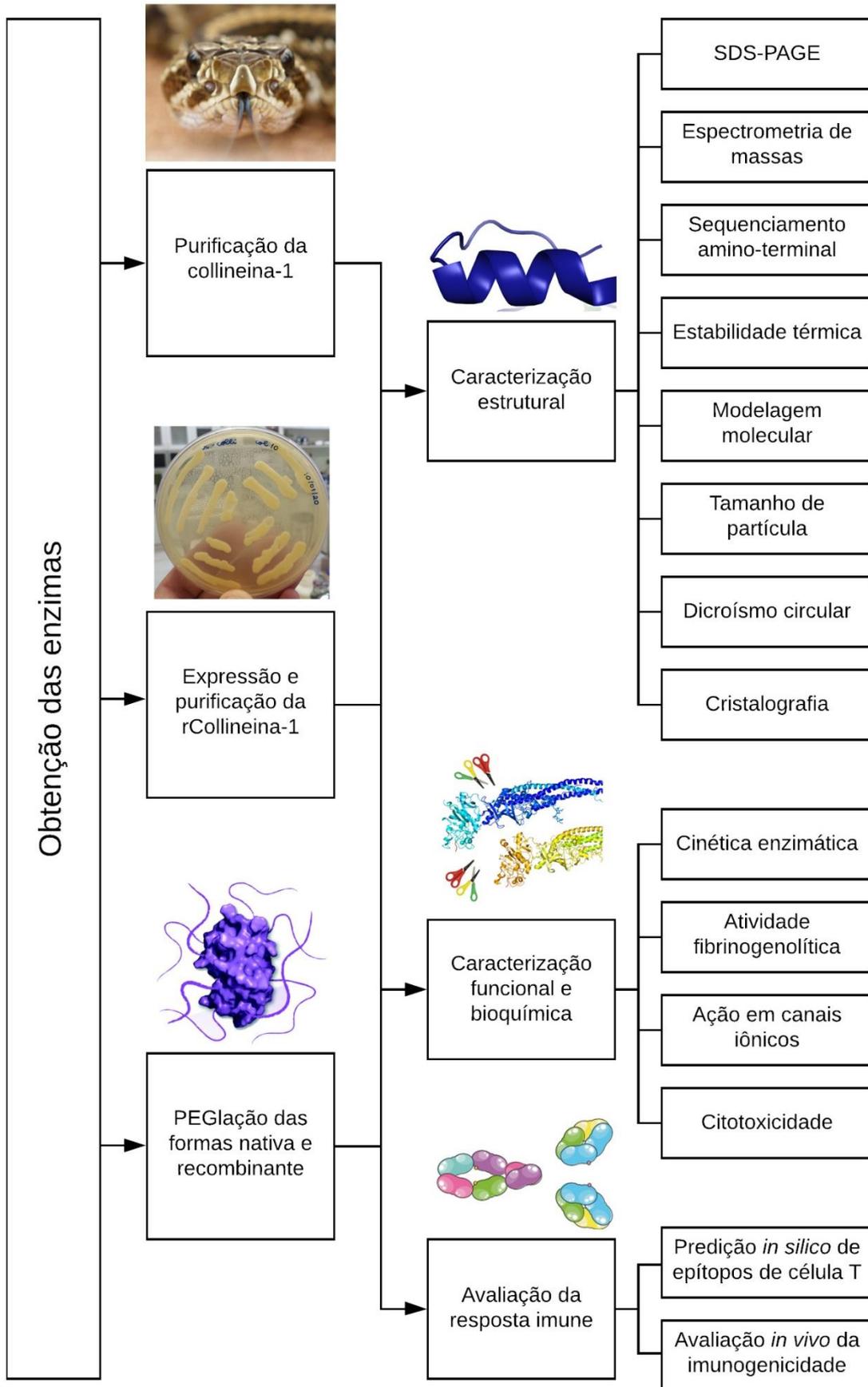
Este projeto teve como objetivo a produção e caracterização de uma serinoprotease da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*, denominada collineina-1, em suas formas nativa (collineina-1), nativa PEGlada (PEG-collineina-1), recombinante (rCollineina-1) e recombinante PEGlada (PEG-rCollineina-1). Buscou-se determinar e comparar os parâmetros funcionais, estruturais e bioquímicos de todas as formas obtidas da enzima. Ademais, estudos de imunogenicidade *in silico* e *in vivo* foram conduzidos. Por fim, analisou-se os aspectos de interação de diferentes formas da collineina-1, além de outras serinoproteases, em canais iônicos dependentes de voltagem.

### 2.2. Objetivos específicos

- Obtenção da collineina-1 purificada a partir da peçonha de *C. d. collilineatus*;
- Expressão da collineina-1 recombinante (rCollineina-1) em sistema heterólogo, utilizando a levedura *Pichia pastoris*, e sua subsequente purificação;
- Modificação química das formas nativa e recombinante com a conjugação ao derivado de PEG, mPEG-Maleimide, com massa molecular de 5 kDa;
- Determinação dos parâmetros cinéticos ( $K_m$ ,  $k_{cat}$  e  $K_m/k_{cat}$ ) das quatro formas da enzima;
- Comparação estrutural das diferentes formas da enzima;
- Análise *in silico* de peptídeos potencialmente imunogênicos na estrutura da collineina-1;
- Análise da resposta imune *in vivo* das proteínas PEGladas, em comparação com as formas sem esta modificação estrutural;
- Determinação da estrutura terciária da proteína nativa através de modelagem molecular e/ou métodos cristalográficos;
- Comparação da interação com canais iônicos das formas PEGladas e não-PEGladas;
- Investigação da interação da collineina-1 com o canal iônico hEAG1 e hERG1;
- Estudo da inibição de outras serinoproteases no canal iônico hEAG1.

---

## **MATERIAL E MÉTODOS**



**Quadro 1. Apresentação esquemática dos estudos realizados**

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*

A peçonha bruta de *C. d. collilineatus* foi doada pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto, dessecada a vácuo à temperatura ambiente e armazenada a -20 °C. O anexo A apresenta o Certificado de Regularidade do Biotério Central emitido pelo IBAMA, enquanto o anexo B comprova a permissão de acesso ao patrimônio genético da espécie utilizada neste trabalho.

#### 3.2. Quantificação de proteínas

Todas as proteínas foram quantificadas pela determinação da absorvância das amostras em 280 nm, utilizando o equipamento NanoDrop™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A concentração final de proteínas foi determinada levando em consideração o coeficiente de extinção molar da collineina-1 e da rCollineina-1 ( $44.180 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) e as massas moleculares da proteína, em suas diferentes formas [nativa (29,5 kDa), recombinante (33 kDa) e suas formas PEGladas (34,5 kDa e 38 kDa, para as formas nativa e recombinante, respectivamente)].

#### 3.3. Purificação da collineina-1 nativa, a partir da peçonha de *C. d. collilineatus*

Dois passos cromatográficos foram necessários para a purificação da collineina-1 a partir da peçonha bruta de *C. d. collilineatus*, sendo que ambos empregaram a técnica de cromatografia líquida de fase reversa. O processo de purificação foi realizado em sistema de cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography*) Äkta Purifier UPC10 (Chicago, Illinois, EUA).

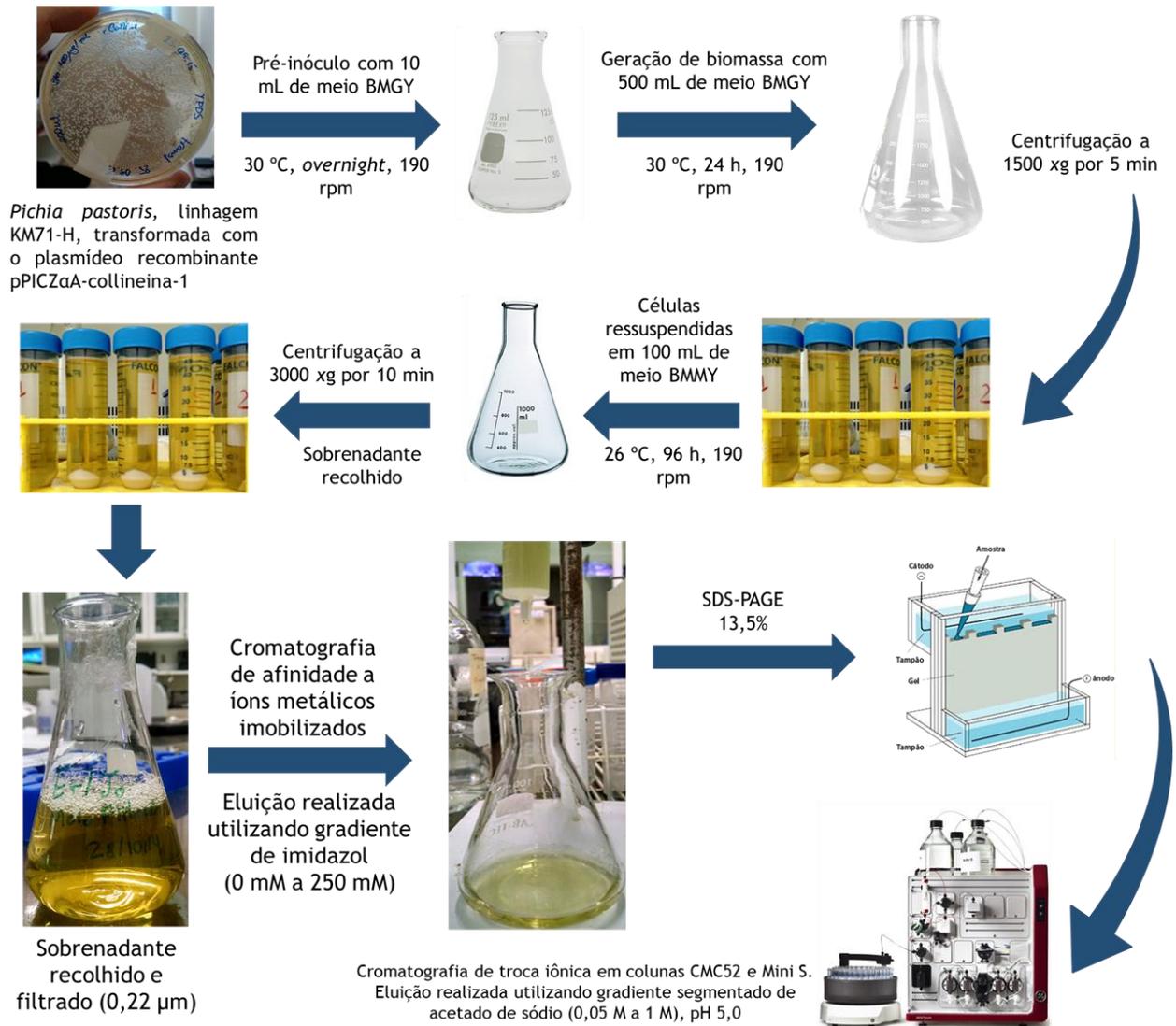
A peçonha bruta de *C. d. collilineatus* (50 mg) foi dispersa em 990 µL de ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1%, acrescido de 10 µL de ácido fórmico (100%). A amostra foi centrifugada a  $13.000 \times g$  por 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido e aplicado em coluna de fase reversa C18 semipreparativa (Phenomenex Jupiter C18 5 µ 300 Å, 250 x 10 mm), previamente equilibrada com solução A (TFA 0,1%). Os componentes da peçonha foram

eluídos utilizando gradiente segmentado até 100% de solução B [0,1% TFA e 80% acetonitrila (ACN)], com vazão de 5 mL/min, coletando 1,5 mL por tubo, com monitoramento do eluente a 214 nm.

De acordo com estudos prévios do grupo de pesquisa, a collineina-1 está presente na fração 32, obtida no fracionamento da peçonha bruta. Desta maneira, esta fração foi recolhida, liofilizada e submetida à segunda etapa cromatográfica em coluna de fase reversa C4 (Phenomenex Jupiter C18 5  $\mu$  300 A, 250 x 4 mm), pré-equilibrada com solução A (TFA 0,1%). Para a eluição dos componentes da amostra, foi utilizado um gradiente descontínuo até 100% da solução B (0,1% TFA e 80% ACN), com vazão de 0,7 mL/min, coletando 0,5 mL por tubo, com monitoramento do eluente a 280 nm. A fração correspondente à proteína purificada foi congelada a -80 °C, liofilizada e armazenada a -20 °C para ensaios posteriores. A porcentagem de recuperação das proteínas foi calculada pelo programa Unicorn<sup>®</sup> 5.2.

### **3.4. Obtenção da collineina-1 recombinante (rCollineina-1)**

A figura 18 ilustra os passos realizados para a expressão e purificação em escala laboratorial da rCollineina-1, conforme metodologia descrita nos itens 3.4.1 e 3.4.2 (BOLDRINI-FRANCA et al., 2019). O Laboratório de Toxinas Animais, no qual a proteína foi expressa, possui permissão para trabalhar com organismos geneticamente modificados (OGMs) de classe de risco 1 (nível de segurança NB1), conforme anexo C.

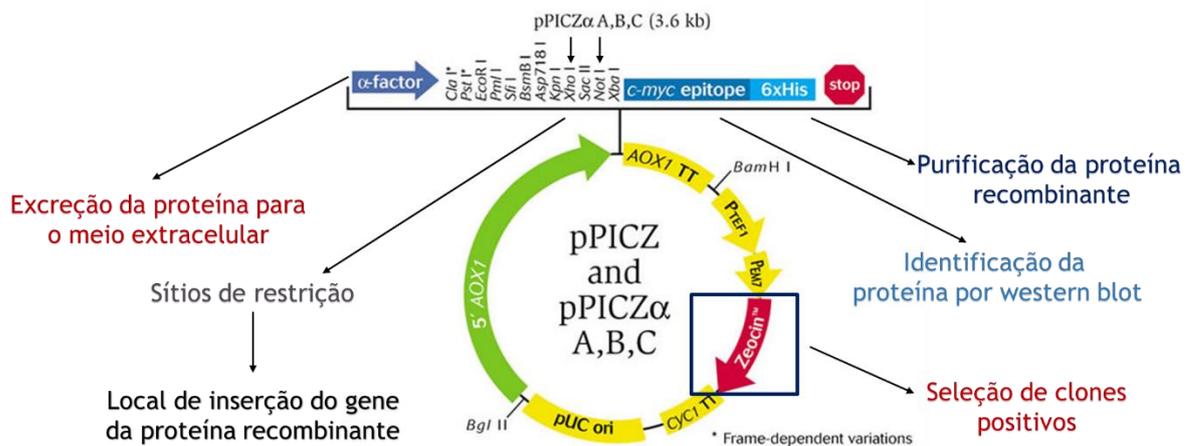


**Figura 18.** Esquema dos procedimentos realizados para a expressão e purificação da rCollineína-1 em sistema heterólogo, utilizando a levedura *P. pastoris*.

### 3.4.1. Expressão da collineína-1 recombinante em sistema heterólogo

O cDNA codificante da r-collineína-1 foi depositado no Arquivo Europeu de Nucleotídeos por Boldrini-França et al. (2015), sob número de acesso LN651356. A expressão da proteína recombinante foi feita segundo os autores, com modificações. As células de *Pichia pastoris*, da linhagem KM71H, transformadas com o plasmídeo recombinante pPICZαA-collineína-1 (Fig. 19), foram pré-inoculadas em 10 mL de meio BMGY [1% extrato de levedura, 2% peptona, 1,34% YNB (base nitrogenada de levedura – *yeast nitrogen base*),  $4 \times 10^{-5}$  M de biotina, 1% glicerol, 100 mM fosfato de potássio pH 6,0] e incubadas a 30 °C, com agitação constante de 190 rpm. Após 24 horas, a cultura foi inoculada em 500 mL de meio

BMGY (*buffered glycerol-complex medium*) e incubada a 30 °C, com agitação constante de 190 rpm, até atingir a densidade ótica de 2 a 6 em 600 nanômetros. Após atingir a densidade ótica desejada, a cultura foi centrifugada a 1500  $\times$  g, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 mL de meio BMMY (*buffered methanol-complex medium*) (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1,34% de YNB,  $4 \times 10^{-5}$  M de biotina, 1% de metanol e 100 mM de fosfato de potássio, pH 6,0) e incubadas a 26 °C sob agitação constante de 190 rpm. O metanol foi repostado a cada 24 horas, a uma concentração final de 0,75% (v/v), para a manutenção da indução. Ao fim de 96 horas de indução, a cultura foi centrifugada a 3000  $\times$  g e o sobrenadante separado, filtrado e usado para a purificação da proteína recombinante.



**Figura 19. Mapa do vetor de expressão pPICZ $\alpha$ .** A figura ilustra a origem de replicação em *E. coli*, o fragmento contendo o promotor AOX1 (5'AOX1), o fator de acoplamento alfa ( $\alpha$ -factor), a região de sítios múltiplos de clonagem, a cauda de epítipo myc (*c-myc epitope*), a cauda de seis resíduos de histidina (6xHis), o fator de término de transcrição AOX1 (AOX1 TT), o promotor de fator de alongamento de transcrição (*Ptef1* - *transcription elongation factor I*) e o fator de término de transcrição CYC1 de *S. cerevisiae* (CYC1 TT). Fonte: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com).

### 3.4.2. Purificação da collineina-1 recombinante

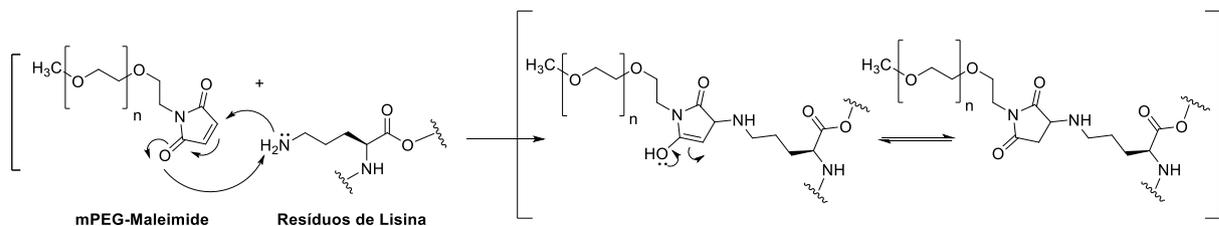
A purificação da rCollineina-1 foi realizada combinando-se três passos cromatográficos em sequência. Na primeira etapa, o meio de cultura, após as 96 horas de indução da expressão, foi submetido à cromatografia de afinidade a íons metálicos imobilizados (IMAC - *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*), utilizando uma resina de Ni<sup>2+</sup> - Agarose (NTA Agarose - Qiagen®, Hilden, Alemanha) sob vazão gravitacional. A eluição da proteína recombinante foi

realizada com gradiente segmentado até 250 mM de imidazol. As frações eluídas da coluna foram analisadas por SDS-PAGE a 13,5%, concentradas e dessalinizadas em Amicon® Ultra – Ultracel® 3K (Burlington, Massachusetts, EUA) e liofilizadas. Em seguida, o material liofilizado foi ressuscitado em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, para ser submetido à segunda etapa cromatográfica. Esta consistiu em uma troca catiônica fraca, realizada em coluna CMC-52 (20 cm x 4 cm), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, sob vazão de 0,7 mL/min. A eluição foi realizada utilizando gradiente descontínuo do mesmo tampão até 1 M e o monitoramento da absorvância foi realizado no comprimento de onda de 280 nm. As frações, com volume fixo de 500 µL, foram coletadas em microtubos de 1,5 mL. A determinação das frações contendo a collineina-1 recombinante foi realizada através de SDS-PAGE. Por fim, os tubos contendo a proteína recombinante foram coletados, concentrados, dessalinizados e submetidos ao terceiro passo cromatográfico. Este consistiu em uma cromatografia de troca iônica forte, em coluna Mini S 4,6/50 PE (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA), utilizando as mesmas soluções do segundo passo cromatográfico, sob vazão de 1 mL/min, coletando-se 500 µL por tubo. O monitoramento da absorvância foi realizado no comprimento de onda de 280 nm. Um gel de SDS-PAGE a 13,5% foi empregado para a determinação das frações contendo a collineina-1 recombinante. A porcentagem de recuperação das proteínas foi calculada pelos programas Unicorn® 5.2.

### **3.5. Modificação química com mPEG-maleimide e purificação da collineina-1 nativa e recombinante PEGladas**

A PEGlação sítio-específica da proteína, em suas formas nativa e recombinante, foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Da-Silva-Freitas e colaboradores (2015), com modificações, utilizando o polímero mPEG-maleimide, com massa molecular de 5 kDa. Este derivado de PEG reage preferencialmente com os grupos tióis das cadeias laterais dos resíduos de cisteína, quando não participantes de ligações dissulfeto (resíduos de cisteína reduzidos). Em segundo lugar, na ordem de preferência de reação, eles reagem covalentemente com a porção amina da cadeia lateral dos resíduos de lisina. A sequência de aminoácidos da collineina-1 apresenta doze resíduos de cisteína. Entretanto, todos eles estão envolvidos em ligações dissulfeto, não estando disponíveis para PEGlação. Desta maneira, a PEGlação da collineina-1 e rCollineina-1 ocorre através da conjugação do mPEG-maleimide no grupamento amina da cadeia lateral dos resíduos de lisina (Fig. 20). Polímeros ativados com o grupo

funcional maleimide sofrem eficiente conjugação às proteínas em pH próximo ao fisiológico na presença de EDTA. Deste modo, foram feitas soluções contendo a collineína-1, em suas formas nativa e recombinante, e mPEG-maleimide, na proporção molar 1:5, em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4, acrescido de 5 mM de EDTA. A reação foi realizada sob agitação à 400 rpm, 25 °C, por 24 horas. A análise da reação foi realizada por cromatografia líquida rápida de proteínas em fase reversa, utilizando coluna C4, de dimensões 0,46 x 25 cm e partícula de 5 µm (Shodex – JP), pré-equilibrada com o solvente A (0,1% TFA). Para a eluição dos componentes da amostra, foi utilizado um gradiente descontínuo até 100% da solução B (0,1% TFA e 80% ACN), sob vazão de 0,7 mL/min, coletando 0,5 mL por tubo, com monitoramento do eluente a 280 nm. Em seguida, um gel de SDS-PAGE a 13,5% foi utilizado para a determinação das frações contendo as enzimas PEGladas.



**Figura 20. Mecanismo proposto da bioconjugação do mPEG-maleimide aos resíduos de lisina da collineína-1 e rCollineína-1, em pH 7,4.** Figura elaborada pelo autor.

### 3.6. Avaliação *in silico* de seqüências de nucleotídeos de diferentes serinoproteases

Os parâmetros físico-químicos teóricos das diferentes formas da collineína-1, assim como de outras serinoproteases utilizadas neste trabalho foram calculados utilizando a ferramenta ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). A predição da presença de seqüências consenso de reconhecimento de N-glicosilações foi realizada empregando o algoritmo NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). As seqüências da collineína-1 e de outras serinoproteases, obtidas no banco de dados UniProt (<https://www.uniprot.org/>) e pela técnica de degradação de Edman foram alinhadas entre si utilizando o algoritmo *online* Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

### 3.7. Caracterização estrutural

#### 3.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Para o acompanhamento dos processos de purificação das proteínas, foi utilizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 13,5% (m/v) em condições desnaturantes, na presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol, de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). Os géis foram corados com *Comassie Brilliant Blue G-250*.

#### 3.7.2. Eletroforese para determinar a presença de proteínas glicosiladas

Para determinar a presença de glicosilações nas formas nativa e recombinante da collineina-1, as proteínas foram submetidas, primeiramente, à eletroforese como descrito no item 3.7.1. O gel foi incubado por 2 horas em solução fixadora contendo ácido acético 10% (v/v) e metanol 35% (v/v) e lavado com água destilada. Posteriormente, o mesmo foi incubado por 1 hora em solução contendo ácido periódico 0,7% (m/v) e ácido acético 5% (v/v). Em seguida, lavou-se novamente o gel com água destilada e este foi, então, incubado durante 10 minutos, por três vezes consecutivas, em solução contendo metabissulfito de sódio 0,2% (m/v) e ácido acético 5% (v/v). Após estes processos, o gel foi corado com ácido periódico-reagente de Schiff, com modificações do método descrito por Doerner e White (1990), e mantido no escuro por 2 horas. Posteriormente, foram realizadas múltiplas etapas de lavagem com água destilada até que fosse definida a coloração rósea das bandas de glicoproteínas. Em seguida, a imagem do gel foi digitalizada.

#### 3.7.3. Sequenciamento amino-terminal

As sequências amino-terminais dos primeiros resíduos de aminoácidos das duas bandas proteicas produzidas pela levedura *P. pastoris* foram obtidas pela técnica de degradação de Edman (EDMAN e BEGG, 1967). Após os procedimentos de obtenção e purificação das proteínas recombinantes, as amostras foram aplicadas diretamente em uma membrana de fibra de vidro (Wako, Japão) e submetida à análise em um sequenciador automático de proteínas, modelo PPSQ-33A (Shimadzu, Kyoto, Japão). O aminoácido derivado da reação com o PITC

foi convertido a PTH-aminoácido e submetido a um processo cromatográfico em sistema FPLC, utilizando coluna de fase reversa e gradiente linear de ACN 80% + TFA 0,1%. A quantificação e identificação dos resíduos foram realizadas por meio da comparação com os tempos de retenção do padrão de aminoácidos (25 pmol), realizado antes do processo de sequenciamento.

#### **3.7.4. Determinação da massa íntegra das formas nativa e recombinante da collineina-1 por espectrometria de massas**

Os experimentos envolvendo espectrometria de massas foram realizados na Central de Espectrometria de Massas de Micromoléculas Orgânicas (CEMMO) do Departamento de Ciências Biomoleculares da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP). A solução (1 µL) contendo a proteína de interesse foi cossedimentada com a matriz contendo ácido 2,5-dihidroxibenzóico [DHB - 10 mg/mL em solução contendo 0,2% de ácido fórmico (AF) e 80% de ACN)], na proporção 1:1 (v/v). As amostras foram ionizadas pela técnica de Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI – *Matrix-assisted laser desorption/ionization*) e analisadas em espectrômetro de massas duplo TOF (*Time-of-flight*) (MALDI-TOF/TOF), modelo Ultraflex II (Bruker Daltonics - Billerica, Massachusetts, EUA), equipado com uma fonte de laser do tipo *Nd-YAG Smartbeam laser* (MLN 202, LTB). A potência do laser foi ajustada para 32%, com incidência de 5.000 a 7.000 tiros, de forma a gerar uma razão sinal/ruído satisfatória. O sistema foi calibrado com o padrão de massas do fabricante (Protein Standard II, Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EUA, para amostras com massa molecular entre 10 e 70 kDa). Os íons foram detectados com o analisador operado no modo linear positivo. Os espectros resultantes foram analisados empregando os programas FlexAnalysis e DataAnalysis (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EUA).

#### **3.7.5. Análise da estabilidade térmica**

Para a análise da estabilidade térmica das quatro formas da enzima, foi empregada a técnica de *Differential Scanning Fluorimetry*, ou Termofluor™. Os experimentos foram realizados em um termociclador em tempo real – Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA), equipado com filtro específico para medir sinais de fluorescência, na presença do corante fluorescente SYPRO® orange (excitação em 492 nm e emissão em 610 nm) (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) (NIESEN et al., 2007).

Em uma placa de 96 poços, alíquotas de 10  $\mu$ L das enzimas a 0,5 mg/mL, solubilizadas em água, foram adicionadas a 10  $\mu$ L de diferentes soluções tampão: acetato de sódio (pH 5,0), cacodilato de sódio (pH 6,0), Tris-HCl (pH 7,0 e pH 8,0) e glicina (pH 9,0 e pH 10,0), sempre a uma concentração final de 50 mM. Em seguida, foi adicionado o corante fluorescente SYPRO<sup>®</sup> Orange Protein Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) na concentração final de 5x.

Para a desnaturação térmica, a placa foi selada e centrifugada a 1000  $\times$  g imediatamente antes do ensaio. As amostras foram aquecidas, de 25 a 95 °C, com aumentos graduais de 1 °C na temperatura, com 1 minuto de espera em cada ponto. A fluorescência das amostras foi lida em cada ponto, utilizando o filtro FRET-FAM ROX, com comprimentos de onda de excitação/emissão de 470/570 nm.

A intensidade da fluorescência foi plotada em função da temperatura. O ponto de inflexão da curva é utilizado para determinar a temperatura de desenovelamento ( $T_m$ , *Melting Temperature*). As curvas de desenovelamento térmico foram processadas de acordo com o protocolo estabelecido por Niesen et al. (2007), e a temperatura de desenovelamento foi calculada utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

### **3.7.6. Determinação in silico da estrutura terciária da collineina-1 por modelagem molecular**

A estrutura teórica da collineina-1 nativa foi obtida através de modelagem molecular, utilizando a ferramenta online SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) (WATERHOUSE et al., 2018). Para a obtenção da estrutura teórica, o software usa uma base de dados na qual há diversas estruturas já depositadas de diferentes proteínas, obtidas a partir de cristalografia de raios X ou ressonância nuclear magnética. No momento em que é colocada a sequência da proteína de interesse, a ferramenta a alinha com a sua base de dados, desenhando a estrutura mais provável e possível de se obter, levando em consideração as estruturas já determinadas anteriormente. Todas as análises e renderização das imagens das estruturas foram feitas utilizando o programa PyMol Molecular Graphics System 2.3.4 (Schrödinger, Nova Iorque, NY, EUA).

### 3.7.7. Determinação do tamanho de partícula

O tamanho médio das proteínas em solução foi determinado utilizando a metodologia de *Dynamic Light Scattering* (DLS). Cada proteína (40 µL), a uma concentração aproximada de 10 mg/mL, contendo 0,1% de TFA, foi analisada em equipamento ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Os dados foram coletados a 18 °C em cubeta Zen2112 e analisados no programa ZetaSizer 7.12 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

### 3.7.8. Avaliação de estruturas secundárias de proteínas por dicroísmo circular

Inicialmente, aproximadamente 300 µg de cada forma da enzima (nativa, recombinante e suas respectivas formas PEGladas) foram diluídas em 300 µL de água ultrapura. Em seguida, a concentração das soluções foi determinada por espectrofotometria, em aparelho NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), no comprimento de onda de 280 nm, utilizando coeficiente de extinção e massa molecular correspondente a cada proteína.

Os espectros de dicroísmo circular (CD) foram obtidos com o acúmulo de 20 varreduras, utilizando cubeta de quartzo de 0,5 mm, com os seguintes parâmetros: velocidade de varredura = 100 nm/min, largura da banda = 2 nm, resolução de passo = 0,5 nm, temperatura = 20 °C. Os dados foram coletados no intervalo de 185-260 nm. Todas as amostras foram analisadas na presença de fluxo de N<sub>2</sub>, para que o O<sub>2</sub> presente no ar não interferisse na leitura dos dados dentro do equipamento.

Os espectros de CD foram analisados em termos de estrutura secundária utilizando o método CDSSTR (SREERAMA e WOODY, 2000), disponível no programa de pacotes para deconvolução de curvas de CD, *Dichroweb* (WHITMORE e WALLACE, 2008) (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>). A unidade utilizada para a interpretação dos espectros foi a MRE (*Mean residue ellipticity / degrees – cm<sup>2</sup>dmol<sup>-1</sup>residue<sup>-1</sup>*), uma das mais utilizadas para proteínas.

### 3.7.9. Estudos cristalográficos

Os experimentos de cristalização estão em andamento no “Laboratório de biologia molecular estrutural”, coordenado pelo Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu.

Inicialmente, o tamanho médio das partículas em solução, bem como o índice de polidispersividade (Pd) da proteína nativa foi determinado utilizando a metodologia de *Dynamic Light Scattering* (DLS), descrita no item 3.7.7. Amostras com menor índice de Pd (< 15%) apresentam probabilidade 80% maior de cristalização em relação às amostras com alto índice de Pd (FERREDAMARE e BURLEY, 1994).

Os experimentos de cristalização da collineina-1, em sua forma nativa, foram realizados pelo processo de *salting-out*, o qual consiste na preparação de uma solução contendo agente precipitante (sais, polietileno glicol ou solvente orgânico) e proteína, com aumento gradativo da concentração deste agente até a supersaturação da proteína. Neste processo, observa-se a precipitação ou cristalização da proteína, caso este processo ocorra lentamente (MCPHERSON, 2009). Os agentes precipitantes adequados para a cristalização da proteína foram selecionados através do método de matriz esparsa (JANCARIK e KIM, 1991), utilizando o *kit* NeXtal DW Block JCSG+ Suite (96x1.5mL) (Qiagen®, Hilden, Alemanha) e refinados de acordo com a figura 21.

24% PEG MME 2000	26% PEG MME 2000	28% PEG MME 2000	30% PEG MME 2000	32% PEG MME 2000	34% PEG MME 2000	100 mM sulfato de Lítio
34% PEG 4000	36% PEG 4000	38% PEG 4000	40% PEG 4000	42% PEG 4000	44% PEG 4000	
4% PEG 1000 + 10% PEG 8000	6% PEG 1000 + 10% PEG 8000	8% PEG 1000 + 10% PEG 8000	10% PEG 1000 + 10% PEG 8000	12% PEG 1000 + 10% PEG 8000	14% PEG 1000 + 10% PEG 8000	+ água ultrapura
4% PEG 8000 + 10% PEG 1000	6% PEG 8000 + 10% PEG 1000	8% PEG 8000 + 10% PEG 1000	10% PEG 8000 + 10% PEG 1000	12% PEG 8000 + 10% PEG 1000	14% PEG 8000 + 10% PEG 1000	

**Figura 21. Condições utilizadas na segunda tentativa de obtenção de cristais da collineina-1 nativa.** Nas três condições, foram modificadas as concentrações do agente precipitante presente.

Buscando obter o aumento gradativo da concentração do agente precipitante, foi empregado o método de difusão a vapor, no qual o processo de equilíbrio de duas soluções – a primeira constituída pela solução do agente precipitante e a segunda por esta solução em adição à solução de proteína – dá-se através da fase de vapor, em meio hermeticamente fechado

(MCPHERSON, 2009). Neste método, foi utilizado o sistema de “gota sentada” (*sitting drop*), com volume final de 0,5  $\mu\text{L}$ , sendo 0,25  $\mu\text{L}$  da solução de proteína a 10 mg/mL e 0,25  $\mu\text{L}$  da solução do reservatório. Para montagem das condições, foi utilizada a placa MRC 2 Well Crystallization Plates (Swissci<sup>®</sup>, Neuheim, Suíça) e um sistema automatizado de montagem de placas [Oryx4 system (Douglas Instruments, Hungerford, UK)]. As placas estão mantidas em temperaturas controladas (4, 10, 18 e 25 °C) e os cristais obtidos serão submetidos à difração de raios X no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron [LNLS – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, CNPEM (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais), Campinas, SP].

Os dados coletados serão processados com o programa HKL2000 (OTWINOWSKI e MINOR, 1997) e a determinação das fases para a determinação da estrutura tridimensional será resolvida pelo método de substituição molecular no programa Phaser (MCCOY et al., 2007). O refinamento das estruturas e os ajustes manuais serão realizados, respectivamente, nos programas PHENIX (ADAMS et al., 2010) e Coot (EMSLEY et al., 2010), baseando-se no mapa de densidade eletrônica. A validação dos modelos cristalográficos obtidos será realizada no programa MolProbity (CHEN et al., 2010) e estudos comparativos serão realizados com outras proteínas elucidadas e depositadas no banco de dados público PDB (*Protein Data Bank*).

### **3.8. Caracterização funcional e bioquímica**

#### **3.8.1. Cinética enzimática**

Os ensaios de cinética enzimática foram realizados pelo monitoramento da atividade das enzimas sobre o substrato S-2302 para calicreína plasmática (H-D-Prolyl-L-phenylalanyl-L-arginine-p-nitroaniline dihydrochloride) (Chromogenix, Bedford, MA, EUA). 0,05 nmol da collineina-1 nativa, nativa PEGlada e recombinante PEGlada e 0,0125 nmol da collineina recombinante foram incubados com 200  $\mu\text{L}$  de soluções de diferentes concentrações do substrato (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 mM), em tampão Tris-HCl 50 mM + 50 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,5.

As soluções foram incubadas a 37 °C e a hidrólise do substrato foi monitorada por espectrofotometria, em 405 nm, utilizando leitor de microplacas SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, San Jose, Califórnia, EUA). As leituras de absorvância foram realizadas em intervalos de 7 segundos, durante 45 minutos.

A velocidade de reação ( $V_0$ ) foi expressa em mM de produto formado por segundo, considerando o coeficiente de extinção de  $9,92 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para o produto. Os valores de  $K_m$  e  $V_{\max}$  das enzimas para o substrato S-2302 foram determinados a partir da curva cinética hiperbólica de Michaelis-Menten, e os valores de *turnover* ( $k_{\text{cat}}$ ) e da eficiência catalítica ( $K_m/k_{\text{cat}}$ ) foram calculados a partir dos valores de  $K_m$  e  $V_{\max}$ . Os experimentos foram realizados em triplicata, e os dados foram ajustados com os respectivos erros padrões, calculados utilizando o programa GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

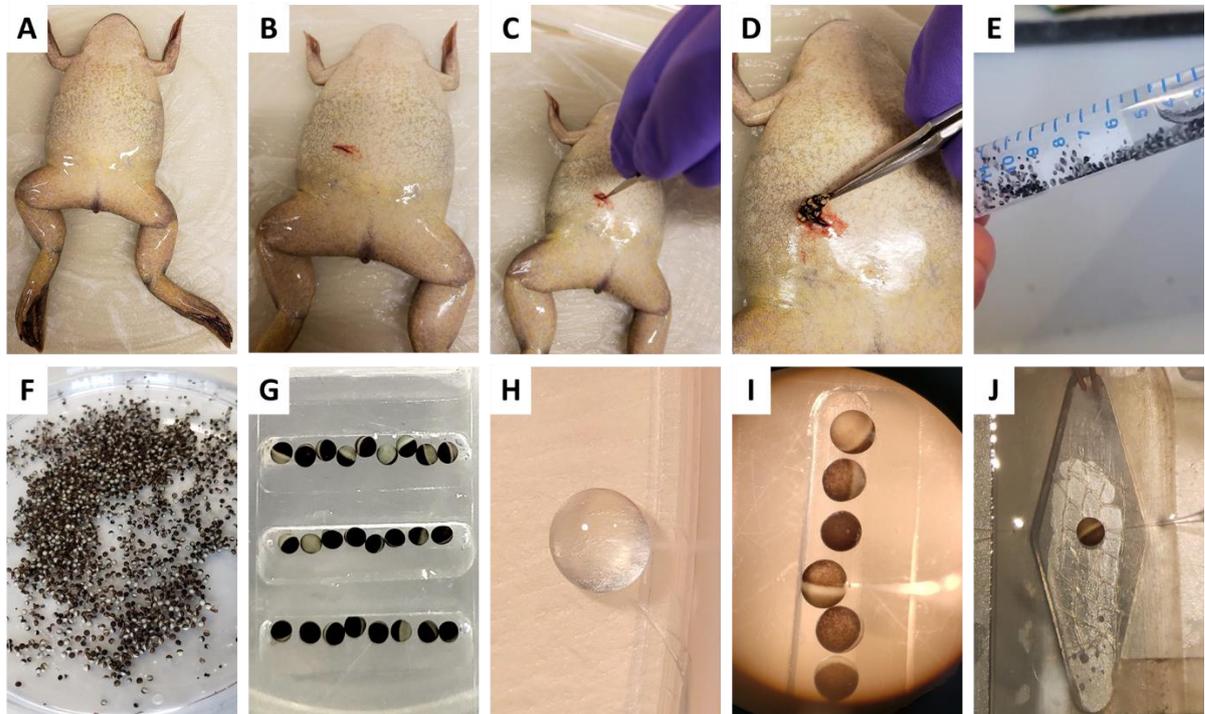
### 3.8.2. Atividade fibrinogenolítica

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio foi realizada seguindo os procedimentos descritos por Rodrigues e colaboradores (RODRIGUES et al., 2000). Uma solução (50  $\mu\text{L}$ ) de fibrinogênio bovino (1,5 mg/mL), em tampão Tris-HCl 50 mM com 50 mM de  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,5, foi incubada com 2  $\mu\text{g}$  de proteína (collineina-1 nativa, recombinante e suas formas PEGladas), a 37 °C, em diferentes intervalos de tempo (5, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos). Para o controle negativo, a solução de fibrinogênio foi incubada com 10  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, nas mesmas condições. Após a incubação, a reação foi interrompida com a adição de 25  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 60 mM, pH 6,8, contendo azul de bromofenol 0,001%, glicerol 10% e  $\beta$ -mercaptoetanol 10%. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C, por 5 minutos, e aplicadas em gel de poliacrilamida a 13,5% com SDS (SDS-PAGE).

### 3.8.3. Atividade em canais iônicos

Os ensaios de eletrofisiologia foram realizados no Laboratório de Toxicologia e Farmacologia da Universidade Católica de Leuven (KU Leuven, Bélgica), sob a supervisão do Prof. Dr. Jan Tytgat. Foi empregada a técnica denominada “voltage-clamp”, utilizando dois microeletrodos, em oócitos de rãs da espécie *Xenopus laevis*. A figura 22 ilustra os passos realizados para a obtenção e injeção de mRNA nos oócitos obtidos através da cirurgia de ovariectomia. Todos os cuidados e procedimentos experimentais estavam de acordo com as diretrizes da Convenção Europeia para a proteção de animais vertebrados utilizados para fins experimentais e outros objetivos científicos, (“*European convention for the protection of*

vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes”, Estrasburgo, 18.III.1986), sob licença número LA1210239.



**Figura 22. Etapas para a obtenção e uso de oócitos em experimentos de eletrofisiologia.** (A) a (D) demonstram a extração de oócitos de um espécime de *X. laevis*; (E) tratamento dos oócitos com colagenase; (F) e (G) seleção de oócitos de estágios V e VI; (H) coleta de amostra de mRNA; (I) injeção de mRNA nos oócitos e (J) experimento de *voltage clamp* em andamento.

### 3.8.3.1. Seleção, preparação e injeção de RNA em oócitos de *X. laevis*

Os animais foram anestesiados com solução de tricafina (1 g/L) e submetidos à cirurgia de ovariectomia parcial para remoção dos oócitos. Após a cirurgia, os oócitos foram tratados com colagenase (1,5 mg/mL), em solução de ND96, sem cálcio, (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM e HEPES 5 mM), pH 7,5, durante duas horas, a 16 °C, para serem defoliculados. Os oócitos que apresentaram o estágio V e VI de maturação foram selecionados e mantidos em solução de ND96 (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, HEPES 5 mM), suplementada com geomicina (50 mg/L) e teofilina (90 mg/L), pH 7,5, para injeção de cRNA. Os cRNAs de cada canal iônico foram transcritos e sintetizados a partir de plasmídeos linearizados, utilizando o kit de transcrição T7 ou SP6 (mMESSAGE mMACHINE, Ambion, Austin, Texas, EUA), dependendo do canal iônico. A microinjeção de RNA nos oócitos foi

realizada usando um microinjetor (Drummond Scientific®, Broomall, PA, EUA), com um volume de injeção programado de 4 a 50 nL de cRNA. O tempo de espera para a expressão dos canais iônicos é de um a cinco dias. Este tempo pode variar de acordo com o canal a ser expresso pelo oócito. Os oócitos que expressaram os canais para potássio (rKv1.1, rKv1.2, rKv1.4, rKv1.6, hKv2.1, hKv3.1, rKv4.2, hKv7.2/7.3, *Shaker*), sódio (rNav1.1, rNav1.2, rNav1.3, rNav1.4, hNav1.5, mNav1.6 e hNav1.8) ou cálcio (rCav3.1 e rCav3.3) sensíveis à voltagem foram utilizados nos ensaios eletrofisiológicos.

### 3.8.3.2. Caracterização eletrofisiológica

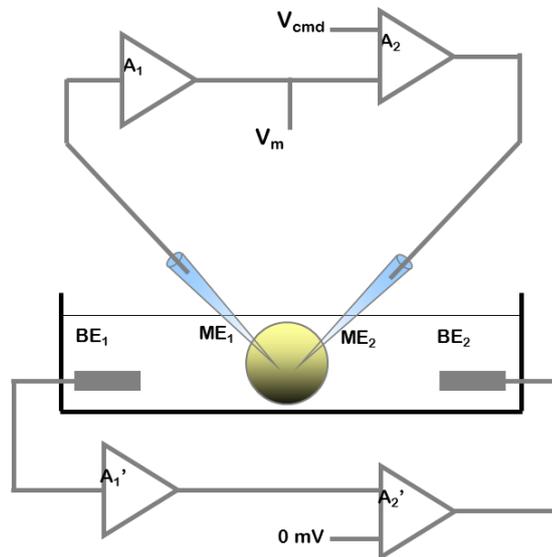
A técnica denominada “*Two-electrode voltage clamp*” (TEVC) é um método amplamente utilizado para investigar as propriedades eletrofisiológicas dos canais iônicos. O fluxo de íons através da membrana celular pode ser medido indiretamente como uma corrente elétrica. Para isso, dois eletrodos foram inseridos no oócito, que foi colocado em um banho contendo 200 µL de solução ND-96. O primeiro eletrodo (ME1) monitora o potencial da membrana ( $V_m$ ). O outro eletrodo (ME2) injeta uma corrente para ajustar o  $V_m$  ao valor fixado e estabelecido ( $V_{cmd}$ ). A corrente injetada é igual, mas oposta em sinal, à corrente que flui através da membrana da célula. Medindo essa corrente, todo o fluxo de íons através da célula pode ser calculado indiretamente. Este cálculo é realizado aplicando a lei de Ohm ( $V = IR$ ), onde  $V$  é a tensão (Volt, V),  $I$  é a corrente (Ampère, A) e  $R$  é a resistência (Ohm,  $\Omega$ ). A condutância dos canais iônicos é inversamente proporcional à resistência ( $R = 1 / g$ ). A corrente dos íons  $K^+$ ,  $Na^+$  ou  $Ca^{2+}$  pode ser calculada com a seguinte equação:

$$I_i = g_i (V_m - E_i)$$

onde  $g_i$  é a condutância do íon,  $V_m$  é o potencial da membrana e  $E_i$  é o potencial de equilíbrio do íon. A diferença entre  $V_m$  e  $E_i$  é a força eletroquímica dos íons. Essa diferença é mantida constante empregando-se esta técnica. Isso resulta em uma relação diretamente proporcional entre a corrente de determinado íon e a sua condutância.

A configuração do equipamento é apresentada esquematicamente na figura 23. O eletrodo de registro de potencial de membrana (ME1) é conectado a um amplificador de feedback (A1). A1 compara o potencial da membrana ( $V_m$ ) com a tensão fixa ( $V_{cmd}$ ). Se houver diferença entre as duas tensões, o amplificador de controle A2 envia uma corrente através do

eletrodo de passagem de corrente (ME2) e a diferença é levada a zero (BAUMGARTNER et al., 1999). A função dos dois eletrodos de banho (BE1 e BE2) é impedir a interferência da solução presente neste compartimento nas medições. Esses eletrodos mantêm a tensão do banho fixa em 0 mV.



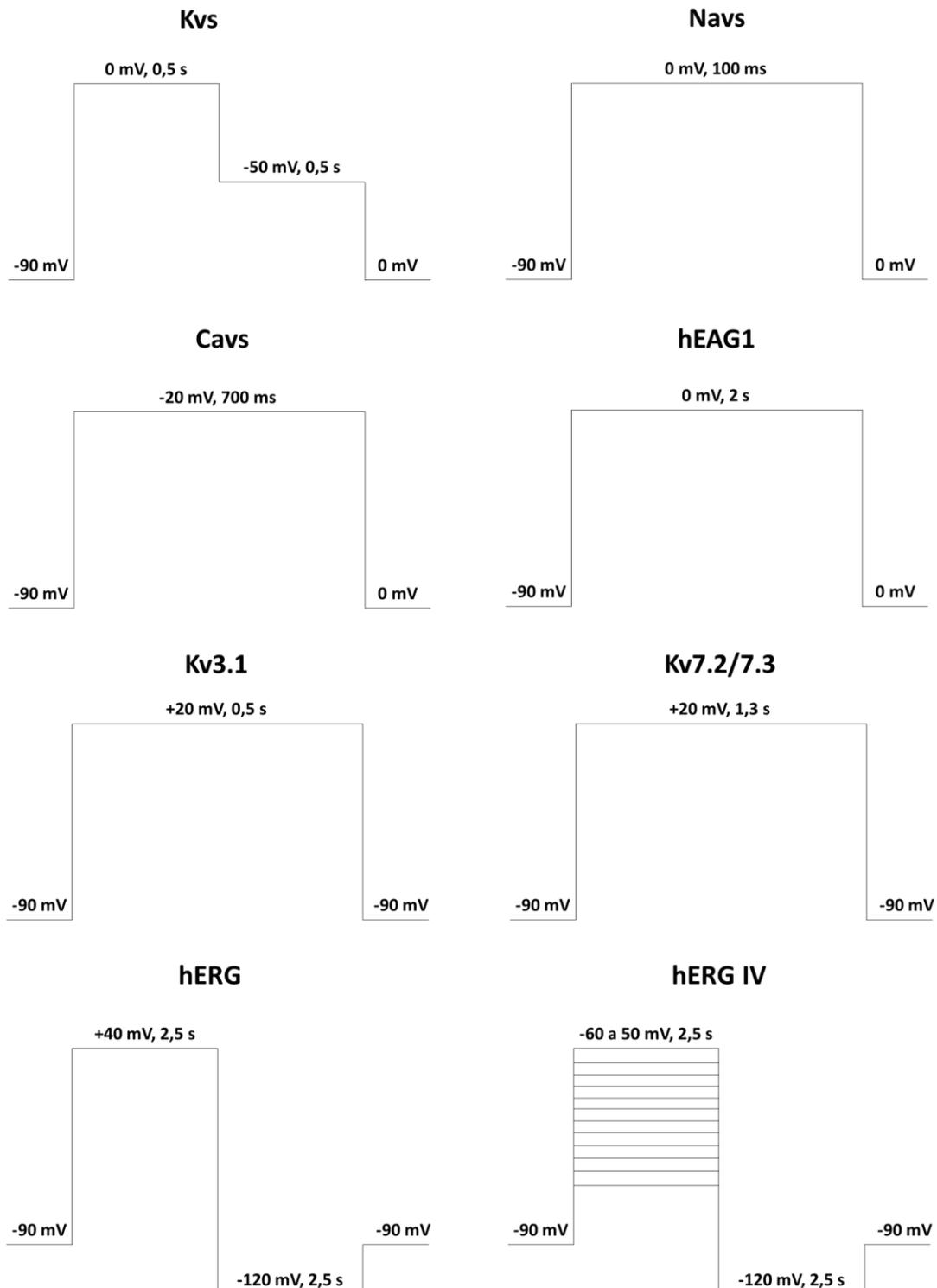
**Figura 23. Representação esquemática da técnica TEVC.** O potencial de membrana ( $V_m$ ) é medido através do eletrodo de medição ME1. O  $V_m$  é comparado ao potencial de comando ( $V_{cmd}$ ). Essa diferença é compensada pela medição do eletrodo 2 (ME2) e determina indiretamente a corrente que flui através da membrana celular. (BE: eletrodo de banho, A: amplificador).

A caracterização eletrofisiológica das proteínas foi realizada utilizando o equipamento GeneClamp 500 amplifier (Axon Instruments<sup>®</sup>, San Jose, California, EUA), conectado a um computador equipado com sistema operacional Windows XP (Microsoft<sup>®</sup>, Redmond, Washington, EUA) e *software* Clampex 10.1 (Axon Instruments<sup>®</sup>, San Jose, California, EUA), responsável pela aquisição e análise dos dados. Micropipetas de vidro foram produzidas utilizando capilares (borossilicato WPI 1B120-6), em um estirador manual (World Precision Instruments<sup>®</sup>, Sarasota, FL, EUA). Micropipetas com resistência entre 0,5 e 1,5 M $\Omega$  foram selecionadas para o uso e preenchidas com uma solução de cloreto de potássio 3 M. A solução denominada ND96 foi utilizada nos experimentos. As correntes de sódio, potássio e cálcio foram amostradas a 20 kHz, 10 kHz e 10 kHz, respectivamente, e filtradas, usando um filtro *low-pass* Bessel de quatro polos, a 2 kHz para sódio e 500 mHz para potássio e cálcio, exceto no canal iônico hERG, no qual as correntes foram filtradas a 1 kHz.

Para a relação corrente-voltagem, os valores de  $I_K$  foram plotados em função da voltagem, e a curva de ativação foi ajustada usando a equação de Boltzmann:  $I_K/I_{\max} = [1 - C/(1 + \exp((V_{1/2} - V_m)/k))]$ , na qual  $I_K$  é a corrente de potássio,  $I_{\max}$  é o valor máximo da corrente de potássio,  $C$  é a constante representando a fração não ativada,  $V_{1/2}$  é o ponto médio da voltagem de ativação,  $V_m$  é o potencial da membrana e  $k$  representa o fator de inclinação (*slope factor*).

Os valores da relação dose-resposta foram ajustados usando a equação de Hill:  $y = 100/[1 + (IC_{50}/[toxina])^h]$ , onde  $y$  é a amplitude do efeito induzido pela toxina,  $IC_{50}$  é a concentração da toxina capaz de inibir 50% da corrente,  $[toxina]$  é a concentração da toxina e  $h$  é o coeficiente de Hill.

### 3.8.3.3. Protocolos utilizados nos experimentos de eletrofisiologia



**Figura 24.** Esquematisação dos protocolos utilizados nos ensaios de eletrofisiologia, envolvendo os diferentes canais iônicos testados. São apresentados os protocolos para testes diretos de atividade e os protocolos para avaliação da relação da corrente em relação à voltagem (IV, *current-voltage relationship*).

### **3.8.4. Avaliação da citotoxicidade em células mononucleares de sangue periférico (PBMC)**

#### **3.8.4.1. Extração de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)**

Foram utilizados 10 mL de sangue periférico, obtido comercialmente (Innovative Research, Novi, MI, EUA), em tubos heparinizados, de indivíduos saudáveis, sem uso de terapia farmacológica. O sangue foi transferido para um tubo de 50 mL, sendo então acrescentado o mesmo volume (~10 mL) de PBS (tampão fosfato-salino) em temperatura ambiente. Após homogeneização, o sangue foi distribuído em 4 tubos (5 mL cada). A essa mistura, acrescentou-se 5 mL de Histopaque-1077 (Merck, Darmstadt, Alemanha), uma solução contendo polissacarose e diatrizoato de sódio, ajustado a uma densidade de 1,077 g/mL, facilitando a recuperação de células mononucleares viáveis (linfócitos), os quais formam uma camada distinta entre as hemácias e o plasma.

Após homogeneização, todo o material foi centrifugado a  $756 \times g$  por 20 min. Após a centrifugação, a fase contendo os linfócitos foi retirada com a ajuda de uma pipeta Pasteur e centrifugada a  $900 \times g$  por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 5 mL de PBS. Em seguida, o material foi centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente. Novamente, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso com 5 mL de meio RPMI (Gibco, Waltham, Massachusetts, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Waltham, Massachusetts, EUA).

A contagem do número de células em câmara de Neubauer foi feita na presença do corante Turk, seguido pelo plaqueamento das células e tratamento com PBS ou com as diferentes formas da colina-1. As placas foram mantidas em uma estufa umidificada a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, até o momento do uso.

#### **3.8.4.2. Técnica de coloração pelo brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)**

Para a realização do teste de citotoxicidade em células PBMC, foram utilizadas placas de 96 poços, de modo a se reservar 3 poços para a leitura do branco que não receberam células ou tratamento. O restante dos poços recebeu  $5 \times 10^4$  células/poço, com um volume final de 100 µL. As células foram plaqueadas e incubadas por 24 horas em estufa umidificada contendo 95%

de ar e 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C. Após este período, as células foram tratadas com 50 µL de PBS (controle negativo) ou diferentes concentrações de collineina-1 nativa e recombinante, bem como suas formas PEGladas (6,67; 3,33; 1,67; 0,83 e 0,41 nmol/mL) e novamente incubadas por 24 horas à 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub>, até a análise. O controle positivo recebeu 50 µL de cisplatina (Incel –Darrow<sup>®</sup>, EUA).

Após 24 horas de tratamento, os poços, com exceção dos utilizados como branco, receberam 20 µL de MTT (Sigma M2128, EUA), e foram incubados por 3 horas à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as placas foram centrifugadas por 5 min a 900 *xg* e posteriormente invertidas para o descarte do sobrenadante. Em seguida, adicionou-se 100 µL de DMSO (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) em cada poço, e as placas foram mantidas sob agitação por aproximadamente 20 minutos até a total dissolução dos cristais. Por fim, realizou-se a leitura da absorvância em 570 nm (MOSMANN, 1983).

Foram realizados três experimentos independentes, em triplicata, para cada concentração. Os dados obtidos foram transferidos para o software GraphPad Prism 6, no qual gerou-se os gráficos e realizou-se a análise estatística para interpretação dos dados.

### 3.8.5. Predição de epítomos para células T – Ligação ao MHC classe II

A predição de epítomos nas estruturas tridimensionais da collineina-1 nativa e recombinante foi realizada na ferramenta *online* “*Epitope Prediction and Analysis Tools, IEDB Analysis Resource*” (<http://tools.iedb.org/main/tcell/>) (BUI et al., 2005; NIELSEN et al., 2007), para a classe de alelo MHC (complexo principal de histocompatibilidade) classe II. Assim, a sequência de aminoácidos da collineina-1 recombinante foi submetida e os parâmetros para a análise foram determinados.

Para a análise de possíveis epítomos, os seguintes parâmetros foram estabelecidos:

- Espécie: *Homo sapiens sapiens*
- Classe de alelo: MHC classe II
- Alelos utilizados na análise: DRB1\*03:01; DRB1\*07:01; DRB1\*15:01; DRB3\*01:01; DRB3\*02:02; DRB4\*01:01; DRB5\*01:01
- Tamanho dos epítomos: 15 resíduos

Os resultados foram apresentados em forma de tabela, classificando os epítomos de acordo com a sua classificação de imunogenicidade. Em seguida, os peptídeos com maior pontuação foram destacados na estrutura da collineina-1.

### **3.8.6. Avaliação da imunogenicidade das diferentes formas da collineina-1 em camundongos**

Os ensaios em animais descrito neste item foram realizados de acordo com orientações dos princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), sob o protocolo nº 17.1.64.60.0, conforme certificado de aprovação (Anexo D).

#### **3.8.6.1. Tratamento dos animais com as diferentes formas da collineina-1**

Para este ensaio, foram utilizados 25 camundongos, da linhagem BALB/c, entre oito e dez semanas de vida, pesando entre 22 e 25 g. Os animais foram separados em cinco grupos (**1**: controle negativo; **2**: collineina-1; **3**: PEG-collineina-1; **4**: rCollineina-1 e **5**: PEG-rCollineina-1. Os animais dos grupos de 2 a 5 foram imunizados quatro vezes com uma dose de 2 nmol/animal, nos dias 0, 3, 10 e 17 com as diferentes formas da collineina-1. No grupo 1, foram administrados apenas 100 µL de salina, seguindo o mesmo cronograma dos dias para os grupos 2-5. Todas as substâncias foram administradas via intramuscular, no bíceps femoral da pata traseira esquerda do animal.

No 19º dia após o início do tratamento, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com 60 mg/Kg de ketamina (Dopalen, Agripands Brasil Ltda®, Brasil) e 8 mg/Kg de xilazina (Rompun, Bayer Animal Health®, Brasil) para coleta das amostras de 0,5 mL de sangue pela cavidade retro-orbital. Após a coleta os animais foram rapidamente eutanasiados por decapitação.

#### **3.8.6.2. Avaliação da produção de anticorpos utilizando ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

Para a avaliação da produção de anticorpos contra as diferentes formas da collineina-1, foi realizado ensaio imunoenzimático de ELISA indireto. Assim, uma microplaca de 96 poços

de fundo plano (Costar<sup>®</sup>, Corning Incorporated, NY, EUA) foi sensibilizada com 2 µg de cada proteína (collineina-1, PEG-collineina-1, rCollineina-1 e PEG-rCollineina-1) diluídas em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6 (volume total por poço de 100 µL) e incubada a 4 °C, por 16 horas. Como controle positivo, poços da placa foram sensibilizados com 2 µL de soro de um camundongo não tratado. Como controle negativo, foram utilizados poços não sensibilizados, ou seja, apenas com 100 µL de tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6.

Após a incubação, o conteúdo dos poços foi descartado e a placa foi lavada três vezes com PBS. Em seguida, os poços foram bloqueados com 250 µL de leite em pó (Molico, Brasil) 2%, diluído em PBS (MPBS), a 37 °C, por 2 horas. A placa foi lavada três vezes com PBS-Tween (PBS-T) 0,05% e três vezes com PBS. Posteriormente, a placa foi incubada a 37 °C, por uma hora, com 100 µL de soluções contendo o soro dos animais dos cinco grupos, em cinco diluições diferentes: 1:50; 1:150; 1:450; 1:1350 e 1:4050, diluído em MPBS 1%. A placa foi novamente lavada como descrito anteriormente. Após esta lavagem, a placa foi incubada com 100 µL de anticorpos policlonais *anti-mouse*, marcados com peroxidase (*anti-mouse*, IgG-HRP, A9044, Sigma-Aldrich, EUA) diluídos 1:3.000 em MPBS 1%.

Após uma hora de incubação à temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada três vezes com PBS-Tween e três vezes com PBS. Em cada poço foram adicionados 100 µL de substrato OPD – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (SIGMAFAST OPD tablet, SLBM4528V, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluído em 20 mL de água deionizada e ureia (tampão SIGMAFAST com ureia, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 021M8224, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), conforme instruções do fabricante. Aguardou-se cerca de 15 minutos para o desenvolvimento de cor ao abrigo de luz, sendo esta reação interrompida com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M (Merck<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil). A leitura da absorvância foi realizada em 490 nm, em leitor de microplacas (Sunrise-basic Tecan, Swiss). O ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida de uma análise post-hoc por meio do teste de Tukey (p < 0,05).

### 3.9. Análise estatística

A análise dos dados e dos gráficos dos passos cromatográficos para a purificação das diferentes formas da toxina foi realizado utilizando o programa Origin Pro versão 9.0 (OriginLab Corporation, EUA). Para a determinação das significâncias entre as médias, foi empregada a análise de variância a um critério (ANOVA one-way). O teste “t” *student* foi utilizado para calcular a significância da diferença entre duas médias para dados não pareados.

Os dados estatísticos foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad software, Inc., EUA). Para os demais cálculos envolvendo transformações numéricas e proporções matemáticas, foi empregado o programa Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, EUA).

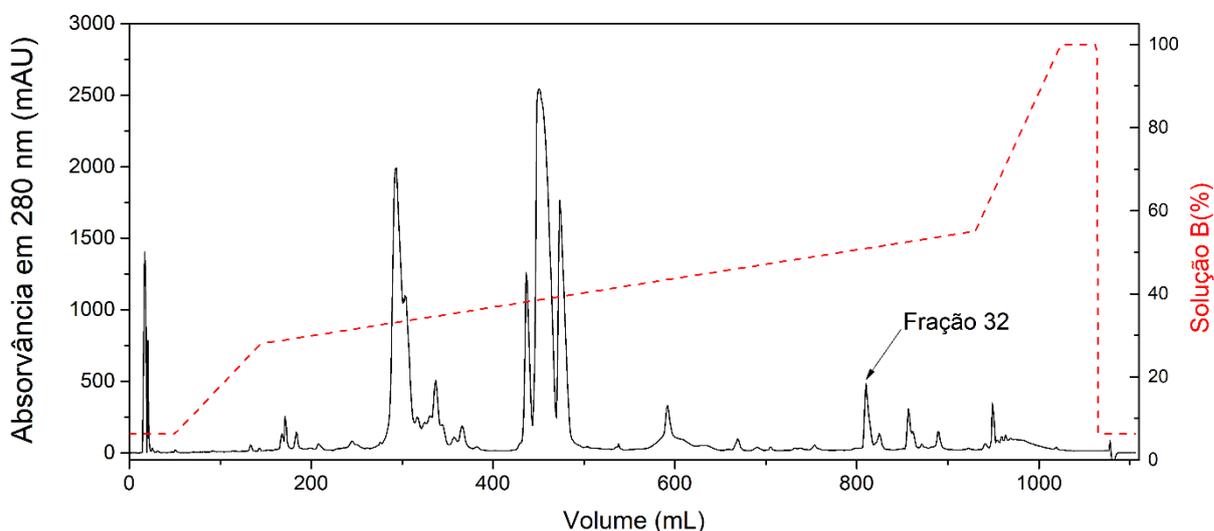
---

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

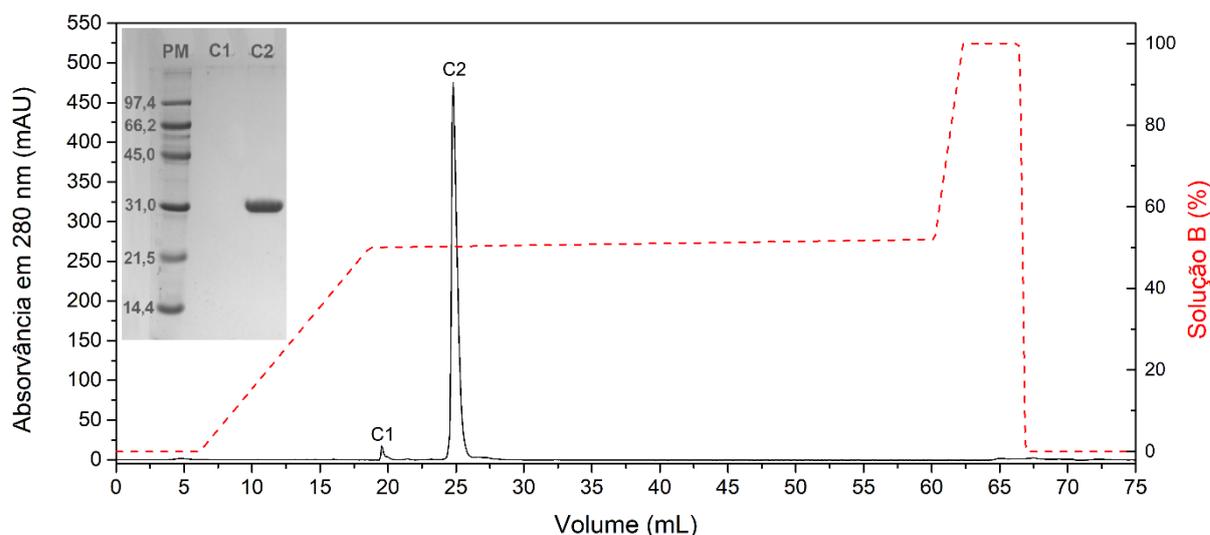
### 4.1. Purificação da collineína-1 nativa a partir da peçonha bruta de *C. d. collilineatus*

O fracionamento da peçonha bruta de *C. d. collilineatus*, em coluna de fase reversa semipreparativa C18, resultou na obtenção de 43 picos, denominados de 1 a 43. De acordo com estudos anteriores (OLIVEIRA et al., 2019), a collineína-1 é encontrada na fração 32 (Fig. 25), eluída com aproximadamente 51% da solução B (ACN 80% + TFA 0,1%). Deste modo, esta fração foi recolhida, liofilizada e separada para a próxima etapa cromatográfica.



**Figura 25. Perfil cromatográfico da peçonha bruta de *C. d. collilineatus* em coluna de fase reversa C18 semipreparativa.** A coluna (250 x 10 mm) foi equilibrada com TFA 0,1% (solução A) e a amostra foi eluída com um gradiente segmentado (linha vermelha) de acetonitrila até 100% de solução B (ACN 80% e 0,1% TFA). Vazão de 5 mL/min. Temperatura: 25 °C. As frações foram separadas de acordo com os picos de absorvância em 280 nm.

Na segunda etapa cromatográfica, em coluna de fase reversa C4, foram obtidas duas frações – denominadas, respectivamente, C1 e C2 (Fig. 26). A fração contendo a proteína nativa (C2) foi confirmada por SDS-PAGE, que apresentou uma banda eletroforética na faixa de 30 kDa (Insero, Fig. 26) e por espectrometria de massas, na qual foi observado um íon com  $m/z$  de 29.474 (Fig. 27).



**Figura 26. Perfil cromatográfico da fração 32 em coluna de fase reversa C4.** A coluna de fase reversa C4 (250 x 4 mm) foi equilibrada com TFA 0,1% (solução A) e a amostra foi eluída com gradiente segmentado (linha vermelha) de acetoneitrila até 100% da solução B (acetoneitrila 80% e TFA 0,1%), sob vazão de 0,7 mL/min. Volume coletado por tubo: 500  $\mu$ L. Temperatura: 25  $^{\circ}$ C. **Inserto:** SDS-PAGE a 13,5%. **PM:** Padrão de massa molecular de 97,4 a 14,4 kDa. **C1** e **C2** são correspondentes aos picos obtidos na etapa cromatográfica.

**Tabela 2. Recuperação da collineina-1 nativa da peçonha de *C. d. collilineatus* nos passos cromatográficos utilizados para o seu isolamento.**

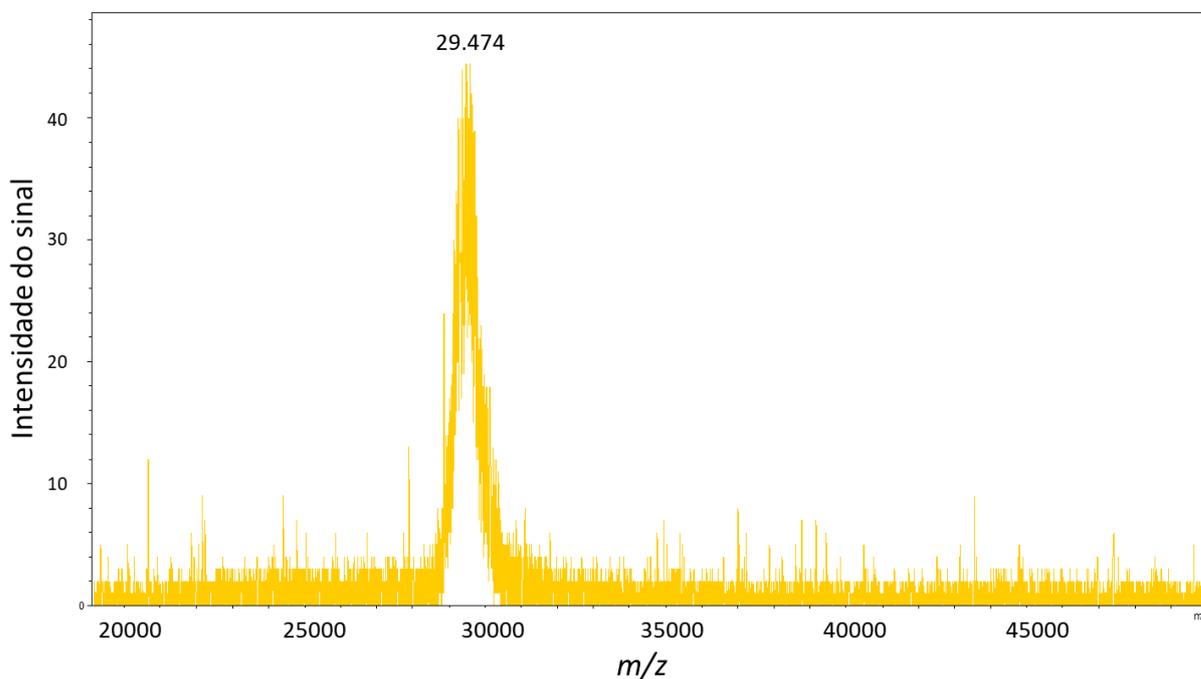
Passo cromatográfico	collineina-1 nativa	
	Massa (mg)	Recuperação (%)
Peçonha bruta	50	100
RP-FPLC - Coluna C18	1,07	2,14
RP-FPLC - Coluna C4	1,05	2,09

Embora a cromatografia em fase reversa possa levar à desnaturação de algumas proteínas, por conta da exposição à acetoneitrila e ácido trifluoroacético utilizados no processo cromatográfico, as SVSPs não são afetadas significativamente pelo uso destes componentes. Em trabalhos anteriores, foi demonstrado que SVSPs isoladas da peçonha de *Bothrops jararaca*, utilizando cromatografia em fase reversa, mantiveram cerca de 85% de sua atividade proteolítica (SERRANO et al., 2000). Adicionalmente, Boldrini-França e colaboradores (2015) demonstraram que a collineina-1 mantém elevado percentual de atividade catalítica durante o processo de purificação, utilizando cromatografia em fase reversa. As SVSPs possuem doze

resíduos de cisteína em sua sequência de aminoácidos, envolvidos em seis ligações dissulfeto (PARRY, M. A. et al., 1998), o que auxilia na manutenção da estrutura terciária da proteína, mesmo em condições drásticas, como o uso de solventes orgânicos. Os resultados obtidos neste trabalho, sobre os possíveis efeitos da acetonitrila na relação estrutura-atividade da collineína-1, estão discutidos no item 4.5.1.

A recuperação da collineína-1, a partir de 50 mg de peçonha, é de 2,09%, ou seja, aproximadamente 1,05 mg (Tab. 2). Este resultado está de acordo com a análise proteômica realizada por Boldrini-França e colabores (2010), a qual indica que a proporção de serinoproteases na peçonha bruta de *C. d. collilineatus* é de 1,9%.

A massa teórica da collineína-1, levando em consideração sua estrutura primária, é de 26.683,46 Da, de acordo com os dados fornecidos pela ferramenta ProtParam do portal ExPASy (WILKINS et al., 1999). Entretanto, a massa obtida na espectrometria de massas foi de 29.474 Da (Fig. 27), uma diferença de 2.790,54 Da. Esta diferença observada é devida à presença de glicosilações na proteína, propriedade discutida no item 4.3.



**Figura 27. Espectro de massas da fração C2 obtido por MALDI-TOF.** A amostra foi analisada no espectrômetro de massas Ultraflex II e o espectro de massas foi obtido no modo refletido positivo. Para essa análise, a amostra foi cocristalizada com a matriz de 2,5-dihidroxibenzóico (DHB).

A espectrometria de massas da fração C2 revelou apenas um íon, conforme descrito anteriormente. Adicionalmente, o SDS-PAGE desta fração mostra apenas uma banda eletroforética. Desta maneira, o processo de purificação da collineína-1 nativa foi padronizado utilizando-se dois métodos cromatográficos, empregando a cromatografia em fase reversa, em coluna C18 para o fracionamento da peçonha bruta de *C. d. collilineatus* e coluna C4 para o fracionamento da fração 32, na qual se obteve a enzima de interesse purificada no pico C2.

#### 4.2. Expressão e purificação da collineína-1 recombinante

O uso da levedura metilotrófica *P. pastoris* como célula hospedeira para a expressão de proteínas recombinantes tem se tornado cada vez mais comum. Esta espécie, além da sua facilidade de manipulação genética, apresenta altas taxas de densidade celular, favorecendo a obtenção em larga escala de proteínas recombinantes, aliada a um baixo custo de produção (DALY e HEARN, 2005). Na literatura, é possível encontrar numerosos trabalhos científicos nos quais essa levedura é empregada a fim de obter proteínas recombinantes (GURKAN e ELLAR, 2005; SANTOS-FILHO et al., 2014; BERTHELEME et al., 2015; PRADNIWAT e ROJNUCKARIN, 2015; KARNAOURI et al., 2017; LIANG et al., 2017; LI et al., 2019; VIJAY et al., 2020), mostrando, assim, sua importância como ferramenta na obtenção de biomoléculas com potencial biotecnológico.

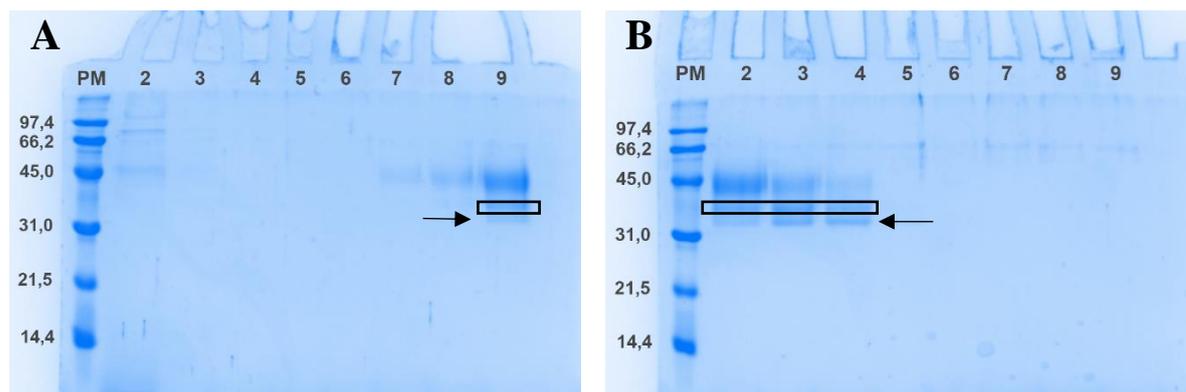
A expressão da collineína-1 recombinante foi realizada segundo Boldrini-França e colaboradores (2015), com modificações. No protocolo original, a enzima foi obtida em meio BMM (1,34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$  M de biotina, 1% metanol, 100 mM fosfato de potássio pH 7,0). Entretanto, nestas condições, não era possível a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade a íons metálicos imobilizados (IMAC), pois não havia interação da proteína com a fase estacionária da coluna cromatográfica. A hipótese mais provável apresentada pelos autores é de que a região C-terminal, onde encontra-se a cauda de polihistidina, é clivada por proteases endógenas da levedura nas condições de expressão em meio BMM, impossibilitando, assim, sua purificação através de cromatografia de afinidade. Além disso, a proteína exibiu baixa solubilidade, apresentando um rendimento em solução inferior ao necessário para testes *in vivo*. Desta maneira, a proteína foi expressa em meio BMGY (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1,34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$  M biotina, 1% glicerol, 100 mM fosfato de potássio pH 6,0), no qual os problemas acima mencionados foram solucionados.

No gene que codifica a collineína-1, o *Open Reading Frame* (ORF) codifica uma proteína de 262 resíduos de aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 18 resíduos, um pró-peptídeo de 6 resíduos e um domínio serinoprotease de 238 resíduos. O vetor de expressão possui uma região que codifica um peptídeo que sinaliza a excreção da proteína para o meio extracelular, denominado fator  $\alpha$  (BRAKE et al., 1984), além da cauda de poli-histidina na região C-terminal da proteína (LOUGHRAN e WALLS, 2011). Deste modo, a primeira etapa cromatográfica, utilizando a técnica de afinidade a íons metálicos imobilizados (IMAC), foi feita utilizando o meio de cultura previamente centrifugado e filtrado como material de partida.

Para a eluição do material aderido à fase estacionária, foi utilizado um gradiente descontínuo de imidazol (0 a 250 mM). As frações foram recolhidas de acordo com a concentração deste componente, sendo que para cada uma, dois volumes de coluna, totalizando 10 mL, foram aplicados. Cada volume de coluna (CV) foi considerado uma fração distinta. Após a cromatografia, um SDS-PAGE a 13,5% foi utilizado para avaliar em qual fração a collineína-1 estava presente.

A técnica cromatográfica de afinidade a íons metálicos imobilizados na fase estacionária foi escolhida, uma vez que é a mais utilizada para a purificação de proteínas recombinantes contendo cauda de poli-histidina, como é o caso da rCollineína-1 (CHAGA, 2001). Essa metodologia é fundamentada na interação do anel imidazol dos resíduos de histidina, presentes na porção C-terminal da proteína, com o níquel imobilizado na fase estacionária da coluna. Desta maneira, como esta cauda encontra-se na porção C-terminal da proteína, há uma forte interação destes resíduos com a fase estacionária, enquanto os outros compostos presentes não apresentam tal capacidade de interação. Assim, eles são eluídos nos processos de lavagem da coluna após a aplicação da amostra. Por outro lado, a proteína recombinante é eluída quando há a aplicação do gradiente de imidazol na fase móvel (LOUGHRAN e WALLS, 2011).

Conforme dados de estudos anteriores (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2019), a rCollineína-1 corresponde à banda destacada por uma caixa na figura 28, uma vez que esta não era observada na linhagem da levedura não transformada com o vetor de expressão da rCollineína-1. Além disso, essa banda apresenta massa molecular próxima à esperada, na faixa de 30 kDa, para a proteína recombinante.



**Figura 28.** Perfil da SDS-PAGE (13,5%) das frações coletadas na cromatografia de afinidade a íons metálicos mobilizados (IMAC). Corrida de 1,5 h a 110V, 8,2 mA, corado com *Coomassie*<sup>TM</sup> Brilliant Blue G-250 PM: padrão de massas moleculares de 97 a 14,4 kDa. **Conteúdo dos poços dos géis:** **A:** 1) PM; 2) Meio de cultura eluído da coluna cromatográfica – material que não interagiu com a fase estacionária; 3) Material eluído com 2 CV de tampão A após aplicação da amostra; componentes eluídos com imidazol: (4 e 5) 10 mM; (6 e 7) 25 mM; (8 e 9) 50 mM. **B:** 1) PM; componentes eluídos com imidazol: (2) 50 mM; (3 e 4) 75 mM; (5 e 6) 100 mM; (7, 8 e 9) 250 mM. **Destaque retângulo:** banda correspondente à collineina-1 recombinante. **Seta:** rCollineina-1 com diferente padrão de glicosilação.

O sequenciamento amino-terminal das duas bandas na região de 30 kDa indicou a mesma sequência de aminoácidos referente à collineina-1 (Tab. 3). Neste contexto, a presença da banda indicada pela seta (Fig. 28) pode ser explicada devido a diferenças no conteúdo de carboidratos adicionados à proteína.

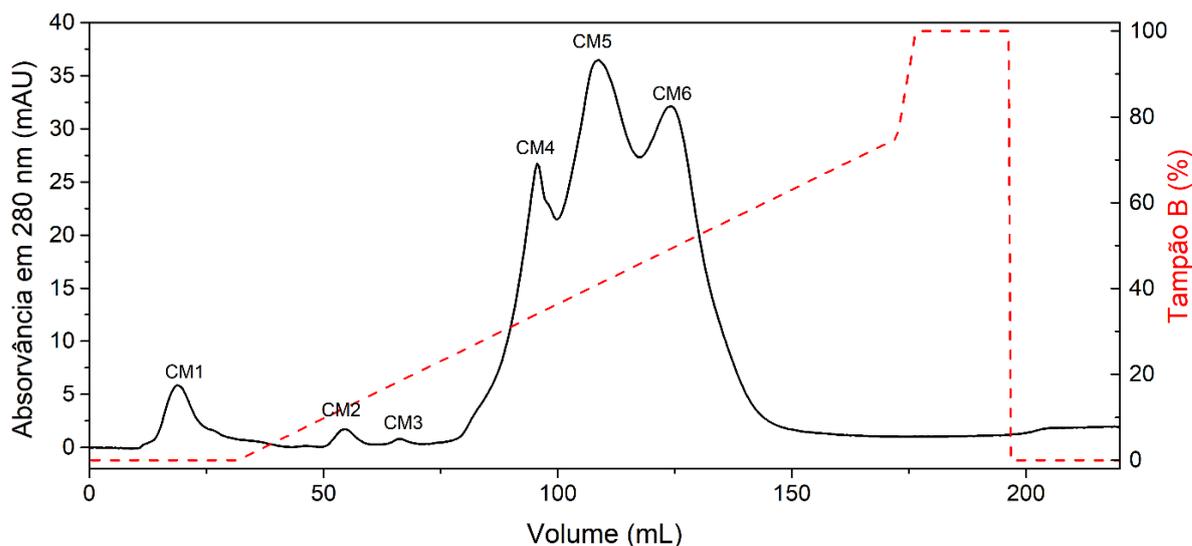
**Tabela 3. Sequenciamento amino-terminal dos resíduos de aminoácidos das duas bandas eletroforéticas obtidas na produção heteróloga da rCollineina-1.** Os resíduos destacados em quadros pretos representam aqueles identificados durante o processo de sequenciamento, enquanto os vermelhos representam aqueles adicionados à sequência da proteína durante o processo de clonagem e expressão heteróloga (epítipo *myc* e cauda de poli-histidina).

Massa molecular (kDa)	Sequenciamento amino-terminal
30,346	VIGGDECNINEHNFVALY <sup>W</sup> YWS <sup>S</sup> QSF <sup>L</sup> CGGT <sup>L</sup> LINGEW <sup>V</sup> LTA <sup>A</sup> HCDRKHILIIY VGVH <sup>D</sup> RSVQFDKEQRRFPKEKYFFNCRNNFTKW <sup>D</sup> KDIMLIRLNKPVSYSEHI APLSLPSSPPIVGSVCRVMGWGTIKSPQETLPDVPHCANINLLDYEVCR <sup>T</sup> AH PQFRLPATIRILCAGVLEGGIDTCHRDSGGPLICNGEFQGI <sup>V</sup> SWG <sup>D</sup> GS <sup>C</sup> QAQP DKPALYSKVFDHLDWIQNI IAGSETVNCPSAAAS <sup>F</sup> LEQ <sup>K</sup> LISE <sup>D</sup> LN <sup>S</sup> AV <sup>D</sup> H HHHHH
33,318	VIGGDECNINEHNFVALY <sup>W</sup> YWS <sup>S</sup> FLCGGT <sup>L</sup> LINGEW <sup>V</sup> LTA <sup>A</sup> HCDRKHILIIY VGVH <sup>D</sup> RSVQFDKEQRRFPKEKYFFNCRNNFTKW <sup>D</sup> KDIMLIRLNKPVSYSEHI APLSLPSSPPIVGSVCRVMGWGTIKSPQETLPDVPHCANINLLDYEVCR <sup>T</sup> AH PQFRLPATIRILCAGVLEGGIDTCHRDSGGPLICNGEFQGI <sup>V</sup> SWG <sup>D</sup> GS <sup>C</sup> QAQP DKPALYSKVFDHLDWIQNI IAGSETVNCPSAAAS <sup>F</sup> LEQ <sup>K</sup> LISE <sup>D</sup> LN <sup>S</sup> AV <sup>D</sup> H HHHHH

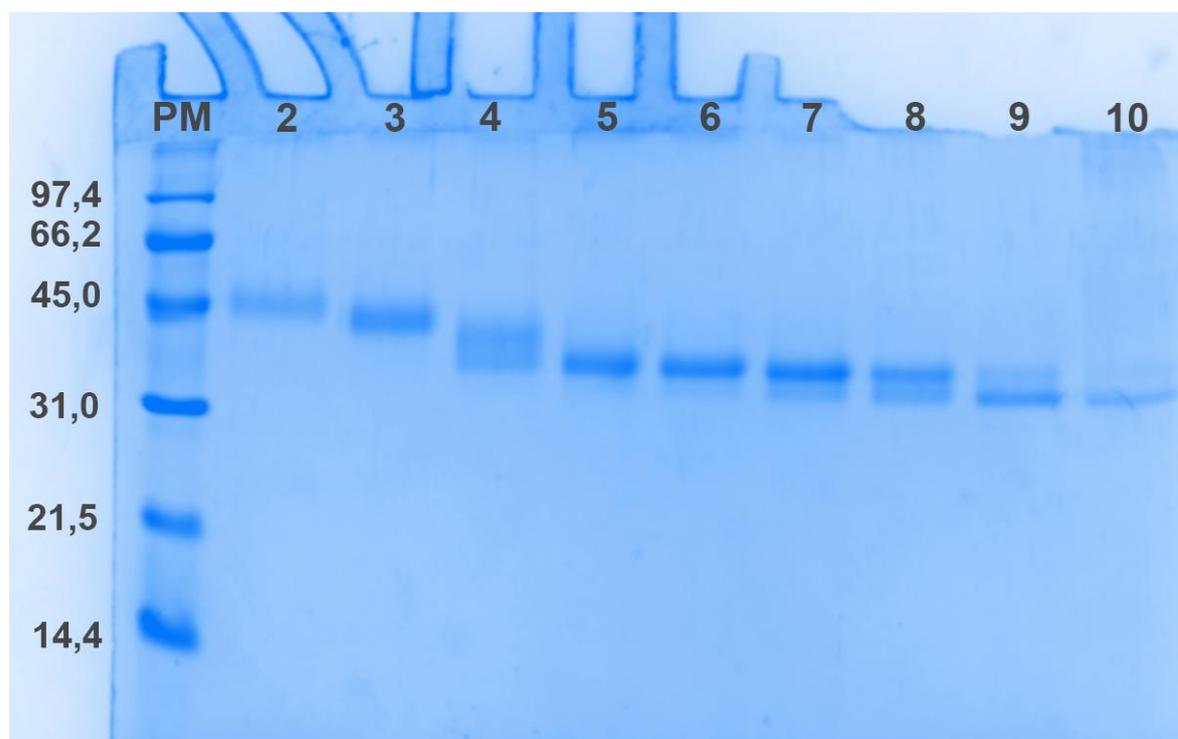
O processo de N-glicosilação é iniciado pela transferência de um oligossacarídeo ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) a um resíduo de asparagina na sequência consenso N-X-S/T (AEBI, 2013). Em seguida, resíduos de manose podem ser incorporados a este núcleo, de forma a estender a estrutura do carboidrato (BRETTHAUER e CASTELLINO, 1999). Entretanto, a indução exacerbada da produção de proteínas heterólogas pode causar um estresse no retículo endoplasmático da levedura, levando a diferenças no processamento da proteína expressa (HOHENBLUM et al., 2004; PUXBAUM et al., 2015). Ademais, a fim constatar a presença de glicosilações nestas proteínas, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida, nas mesmas condições anteriores, porém corado com ácido periódico e reagente de Schiff, explicado adiante no item 4.3.

De acordo com o perfil eletroforético (Fig. 28), este passo cromatográfico não foi suficiente para a purificação da rCollineína-1, uma vez que há a presença de uma banda difusa na faixa de 45 kDa, indicando a presença de contaminantes. Acredita-se que possa ter havido a formação de agregados da collineína-1 recombinante com outras proteínas sintetizadas pela levedura, impedindo sua purificação com apenas um passo cromatográfico. Assim, as frações nas quais a enzima recombinante está presente foram agrupadas, dessalinizadas, liofilizadas e submetidas ao segundo passo cromatográfico, realizado em coluna de troca catiônica fraca CMC-52.

Nesta segunda etapa cromatográfica, foram obtidas seis frações, denominadas CM1-CM6 (Fig. 29). A SDS-PAGE a 13,5% dos componentes presentes nas frações CM4, CM5 e CM6, obtidas na segunda etapa cromatográfica, (Fig. 30) indica a presença de duas bandas próximas a 30 kDa na fração CM6. As proteínas de maior massa molecular, provenientes da levedura *P. pastoris*, estão concentradas nas frações CM4 e CM5. Entretanto, estas frações eluíram em tempos muito semelhantes, não sendo possível concluir o processo de purificação da enzima recombinante.

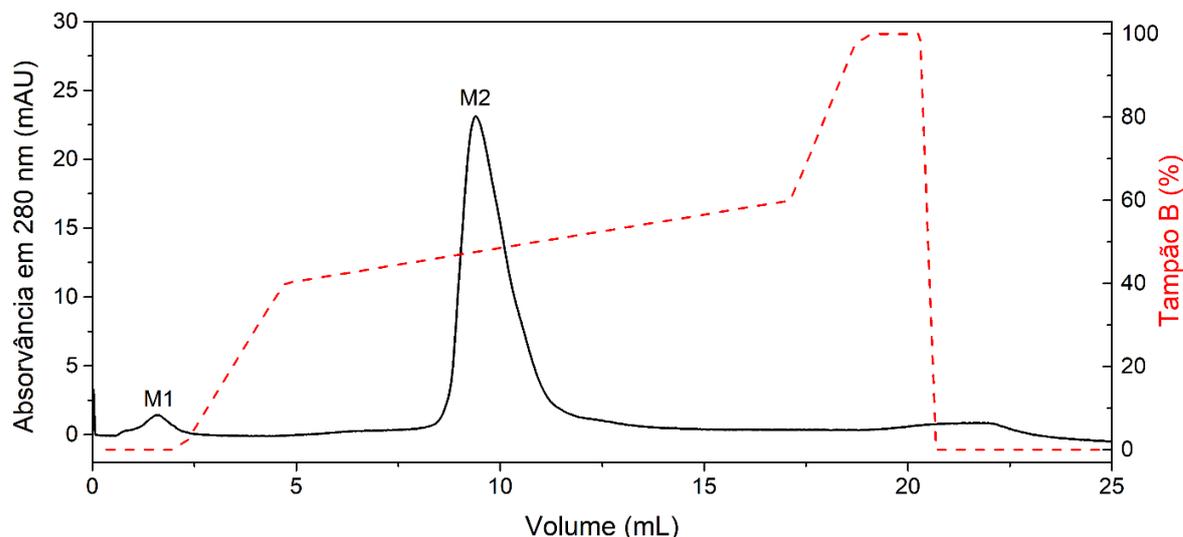


**Figura 29.** Perfil cromatográfico dos componentes eluídos entre 50 e 75 mM de imidazol, em coluna de troca catiônica fraca CMC-52. Coluna de 20 cm x 4 cm, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0 (tampão A). Os componentes da amostra foram eluídos com gradiente descontínuo (linha vermelha) do tampão B (acetato de sódio 1 M, pH 5,0), sob vazão de 0,5 mL/min. Temperatura: 25 °C. Volume coletado por tubo: 0,5 mL.



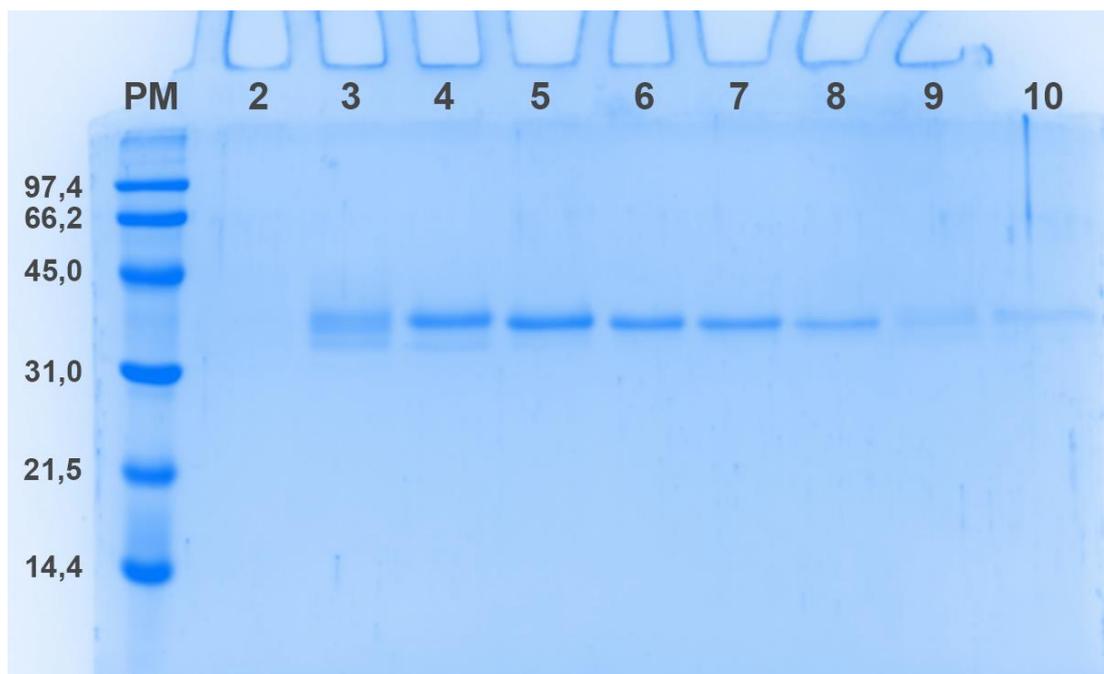
**Figura 30.** Perfil da SDS-PAGE (13,5%) das frações coletadas na cromatografia de troca iônica em coluna CMC-52. Corrida de 1,5 h a 110V, 8,0 mA, utilizando coloração com Coomassie blue G250. 1) PM: padrão de massas moleculares, com valores expressos em kDa. 2) e 3) CM4; 4) CM5; 5-10) CM6.

A fim de finalizar o processo de purificação da rCollineina-1, a fração CM6 foi recolhida, dessalinizada, concentrada e submetida à terceira etapa cromatográfica (Fig. 31). Este passo foi realizado em coluna MiniS 4.6/50 PE (GE LifeSciences®), de troca catiônica forte, buscando certificar a purificação da collineina-1 recombinante.

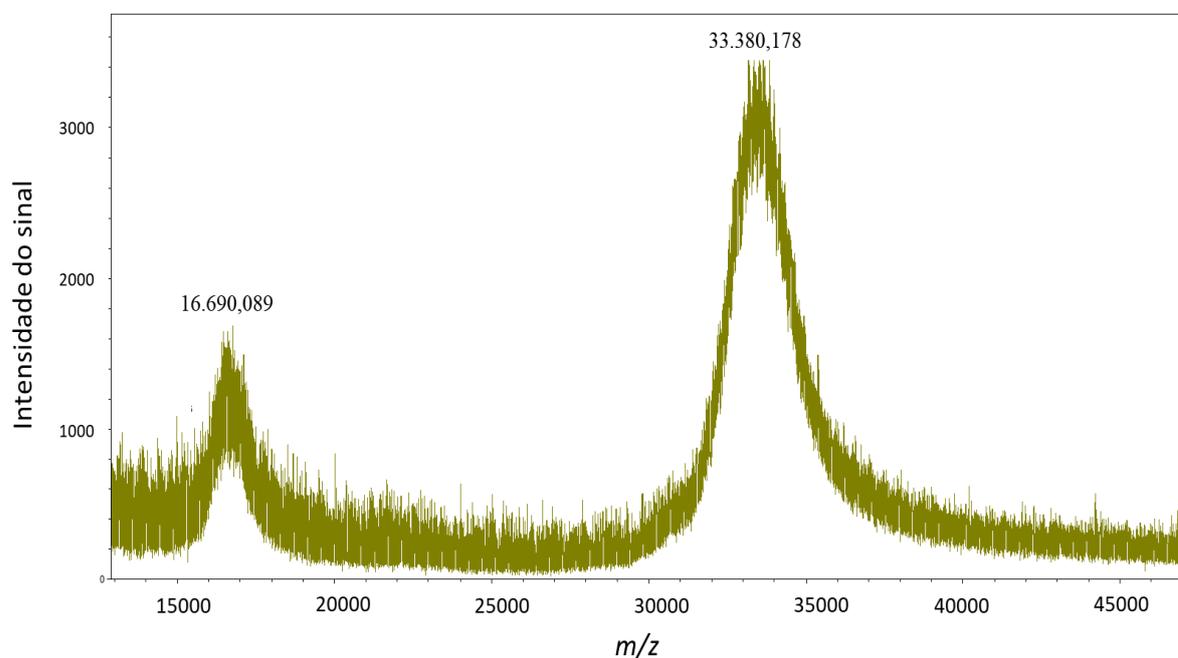


**Figura 31. Perfil cromatográfico da fração CM6 em coluna Mini S 4.6/50 PE.** Coluna de 4,6 mm x N/A, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0 (tampão A). Os componentes da amostra foram eluídos utilizando gradiente descontínuo do tampão B (acetato de sódio 1 M, pH 5,0), sob vazão de 1 mL/min. Temperatura: 25 °C. Volume coletado por tubo: 0,5 mL.

Na terceira etapa cromatográfica, foram obtidos dois picos, denominados M1 e M2 (Fig. 31), sendo o pico M2 predominante. Esta fração foi eluída com aproximadamente 47% do tampão B, semelhante à fração CM6 da segunda etapa cromatográfica, a qual corresponde à rCollineina-1. Estas frações foram recolhidas, dessalinizadas, concentradas e submetidas à análise de pureza utilizando uma SDS-PAGE a 13,5% (Fig. 32) e espectrometria de massas (Fig. 33).



**Figura 32.** Perfil da SDS-PAGE (13,5%) das frações coletadas na cromatografia de troca iônica em coluna MiniS. Corrida de 1,5 h a 110V, 8,0 mA, utilizando coloração com Coomassie blue G250. 1) PM: padrão de massas moleculares, com valores expressos em kDa. 2) Fração M1. 3-10: Diferentes tubos de eluição da fração M2.



**Figura 33.** Espectro de massas da fração M2 obtido por MALDI-TOF. A amostra foi analisada no espectrômetro de massas Ultraflex II e o espectro de massas foi obtido no modo refletido positivo. Para essa determinação, a amostra foi cocristalizada com a matriz de ácido sinapínico.

O perfil da SDS-PAGE das frações M1 e M2, obtidos na terceira etapa cromatográfica, indicam que a collineína-1 recombinante está presente na fração M2, livre do seu contaminante, o qual está presente nas frações CM4 e CM5, obtidas na segunda etapa cromatográfica. Além disso, a espectrometria de massas da fração M2 (Fig. 33) apresenta apenas um composto, com proporção  $m/z$  de 33.380,178. O segundo íon encontrado, com  $m/z$  de 16.690,089 corresponde à proteína duplamente carregada (carga +2).

Assim, padronizou-se a purificação da enzima, em sua forma recombinante, através de três passos cromatográficos. O primeiro utilizando coluna de afinidade (IMAC), seguido de uma troca catiônica fraca, em coluna CMC52, e finalizando com uma coluna de troca iônica forte MiniS.

A partir da primeira etapa cromatográfica, em coluna de afinidade (IMAC), foram obtidos, do material de uma expressão em escala laboratorial, 3,75 mg da proteína recombinante contaminada com proteínas provenientes do metabolismo celular da levedura *Pichia pastoris*. Este material foi aplicado em mais duas etapas cromatográficas, como descrito anteriormente, para a purificação da proteína recombinante. Assim, de acordo com os dados apresentados na tabela 4, observa-se que a collineína-1 recombinante corresponde a 35,2% (1,32 mg) da massa total do material de partida, obtido na primeira etapa cromatográfica. Deste modo, o rendimento de produção desta proteína recombinante é de aproximadamente 13,2 mg de proteína por litro de meio de cultura. Na expressão da collineína-1 em meio BMM, realizada por Boldrini-França e colaboradores (2015), o rendimento da expressão foi de 56 mg/L, porém a proteína apresentava diversos problemas em sua purificação, estabilidade e solubilidade.

**Tabela 4. Recuperação da collineína-1 recombinante nos passos cromatográficos utilizados para o seu isolamento.**

Passo cromatográfico	collineína-1 recombinante	
	Massa (mg)	Recuperação (%)
Material obtido na cromatografia de bancada por afinidade (IMAC)	3,75	100
Cromatografia de troca iônica - coluna CMC52	1,39	36,99
Cromatografia de troca iônica - coluna Mini S	1,32	35,2

Outras SVSPs, de diferentes serpentes, também foram expressas em sistema heterólogo utilizando a levedura *P. pastoris*. Yuan e colaboradores (2009) relataram um rendimento de 3,5 g/L de uma SVSP de *Agkistrodon caliginosus*, enquanto Zhang e colaboradores (2011) obtiveram 315 mg/L de meio de expressão de uma SVSP de *Agkistrodon rhodostoma* e Yang e colaboradores (2009) com um rendimento de 44,5 mg/L de uma SVSP de *Gloydus shedaoensis*. Por outro lado, rendimentos menores também foram relatados, como o obtido por Pradniwat e Rojnuckarin (2015), com 1,95 mg/L de uma SVSP de *Trimeresurus albolabris* e Li et al. (2007), que expressaram uma SVSP de *Bothrops atrox* com um rendimento de 10 mg/L.

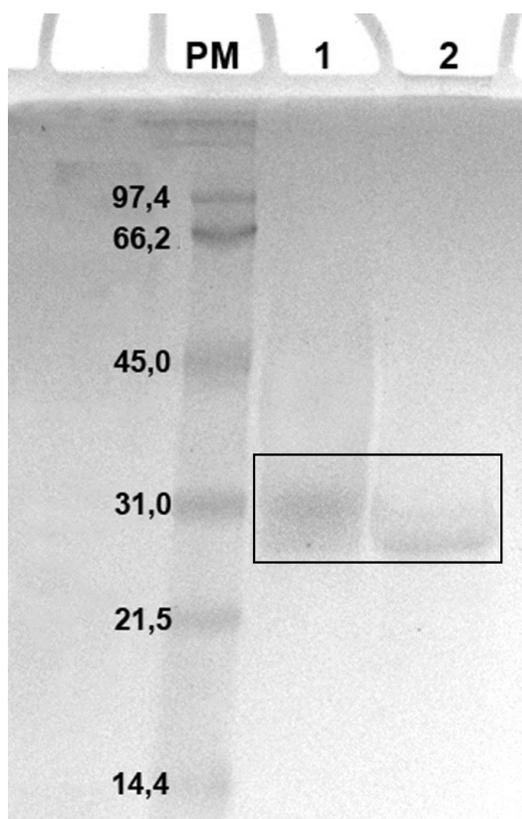
### 4.3. Avaliação da presença de glicosilações na collineina-1

O processo de glicosilação de proteínas pode ser classificado em quatro tipos, baseados na natureza da ligação química com o aminoácido receptor na estrutura: *N-linked*, *O-linked*, *C-mannosylation* e âncoras GPI (glycosylphosphatidylinositol). A glicosilação de proteínas é um processo biológico complexo, finamente regulado e definido. O processamento destes glicanos é uma das partes centrais do mecanismo de controle de enovelamento de proteínas durante a sua produção e envolve uma sequência particular de aminoácidos (SOARES e OLIVEIRA, 2009).

Muitas das glicoproteínas encontradas em peçonhas de serpentes pertencem à classe das serinoproteases. Essas proteínas apresentam, como discutido anteriormente, uma gama de propriedades bioquímicas e estruturais, especialmente no que diz respeito às suas massas moleculares. Neste quesito, há diversos relatos de proteínas com massas moleculares entre 25 e 70 kDa, embora suas estruturas primárias indiquem uma massa molecular em torno de 28 kDa. Esta disparidade sugere que as modificações pós-traducionais desempenham um papel importante nesta propriedade físico-química, entre as quais o processo de glicosilação pode ser um dos mais proeminentes (SAKAI et al., 2006). Como exemplo da influência deste tipo de modificação pós-traducional, a enzima *Bothrops* protease A, presente na peçonha de *B. jararaca*, possui massa molecular predita em torno de 25 kDa. Entretanto, a massa molecular encontrada foi de 67 kDa, implicando que aproximadamente 62% do total da massa molecular desta enzima é devido à presença de glicosilações em sua estrutura (MURAYAMA et al., 2003).

A fim de confirmar a presença de glicosilações nas formas nativa e recombinante da collineina-1, foi feito um gel de SDS-PAGE (13,5%), corado com reagente de Schiff (Fig. 34). Este reagente, aliado ao ácido periódico, é uma importante ferramenta para avaliar a presença

de polissacarídeos em proteínas, marcando, assim, suas possíveis glicosilações. A reação com o ácido periódico oxida os dióis vicinais destes açúcares, o que leva a uma série de ligações subsequentes, formando aldeídos livres que interagem com o reagente de Schiff, criando uma coloração magenta-avermelhada no gel (CLARKE, 1964). Ao analisar os resultados, observa-se que ambas as formas, nativa e recombinante, da collineina-1 apresentam açúcares em sua estrutura, uma vez que é possível a visualização de bandas coradas com o reagente utilizado.



**Figura 34.** Perfil da SDS-PAGE (13,5%) da collineina-1 nativa e recombinante, corado com ácido periódico e reagente de Schiff, para marcar glicoproteínas. Corrida de 1,5 h a 110 V, 8,7 mA. **PM:** padrão de massas moleculares, com valores expressos em kDa. **1)** rCollineina-1 e **2)** collineina-1. A área destacada representa a coloração das enzimas pelos reagentes utilizados, demonstrando a presença de glicoproteínas nas amostras.

A ferramenta *in silico* NetNGlyc indicou um possível sítio de N-glicosilação na posição 81 (sequência NFTK na estrutura primária da collineina-1), com um potencial de 0,6897, acima do limiar de 0,5 estipulado pelo algoritmo (Fig. 35). Este resultado reforça a necessidade de determinar os padrões de glicosilação apresentados pela enzima nas suas formas nativa e recombinante, a fim de determinar quais são as diferenças apresentadas nestas estruturas, uma vez que são produzidos por organismos diferentes.

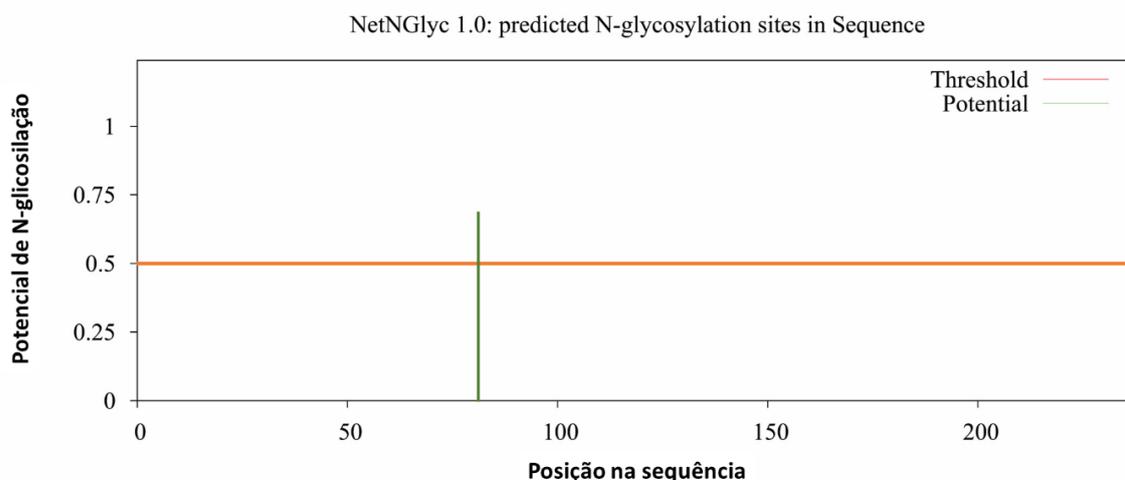
```

Name: collinein-1      Length: 238
VIGGDECNINEHNFVLVALYEYWSQSFLCGGTLINGEWVLTAAHCDRKHILIIYGVHDSVQFDKEQRRFPKEKYFFNCRN      80
NFTKWDKDIMLIRLNKPVSYSEHIAPLSLPSSPPIVGSVCRVMGWGTIKSPQETLPDVPHCANINLLDYECRTAHPQFR      160
LPATIRILCAGVLEGGIDTCHRDSGGPLICNGEFQGVISWGDGSCAQDPKALYSKVFDHLDWIQNIITAGSETVNCPS
.....
N.....
.....

```

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
collinein-1	81 NFK	0.6897	(8/9)	+



**Figura 35. Análise de possíveis sítios de N-glicosilação da collineina-1 pela ferramenta *in silico* NetNGlyc.** A pontuação mínima para que uma proteína seja considerada glicosilada, em determinada posição em sua sequência, é de 0,5 (*threshold*), marcado pela linha horizontal em vermelho. A barra verde ilustra o potencial de glicosilação encontrado (0,6897), na posição 81, na sequência da proteína.

A glicosilação consiste na adição de açúcares às proteínas e é um dos mais complexos tipos de modificações pós-traducionais presentes em células eucarióticas. Esta adição desempenha funções importantes em processos biológicos, auxiliando desde o enovelamento correto de determinada proteína até sua localização celular e reconhecimento de substratos (HEBERT et al., 2005; SOARES e OLIVEIRA, 2009).

Especificamente para SVSPs trombina-símile, foi demonstrado que a N-deglicosilação de uma enzima deste tipo, presente na peçonha de *B. barnetti*, faz com que ela perca sua atividade enzimática, além de diminuir sua estabilidade térmica (VIVAS-RUIZ et al., 2013). Similarmente, uma SVSP isolada da peçonha de *B. jararacuçu* apresentou grande queda na sua atividade enzimática e termoestabilidade (SILVA-JUNIOR et al., 2007). Desta forma, a

diferença apresentada entre a massa teórica e a obtida através da espectrometria de massas da collineina-1, juntamente com o possível sítio de N-glicosilação da proteína e os dados encontrados na literatura, reforçam a proposição de que se trata de uma glicoproteína.

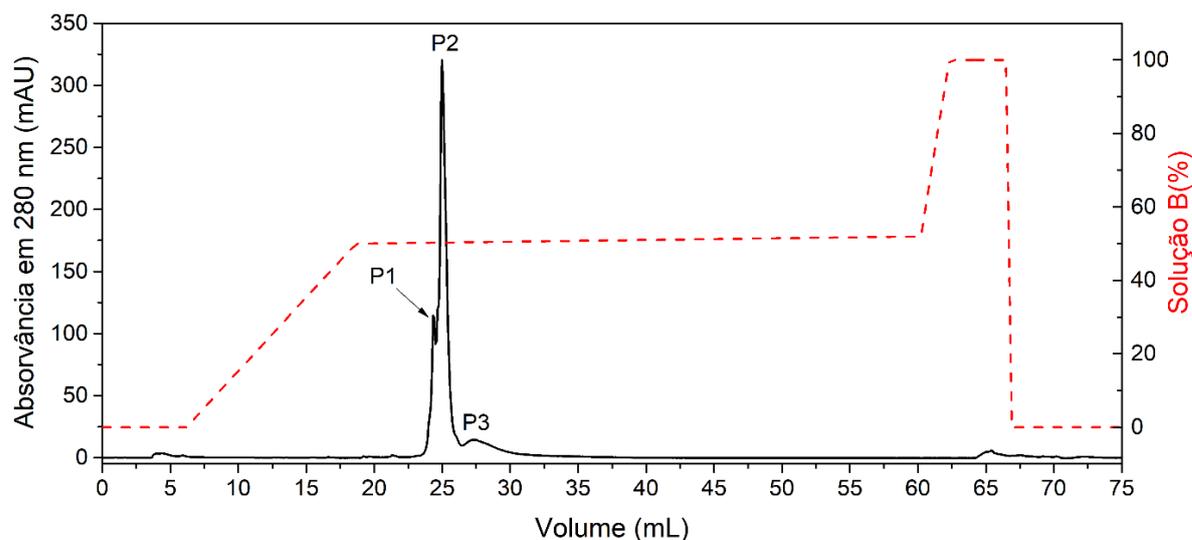
N-glicosilações ocorrem, predominantemente, nas sequências N-X-T/S, na qual X pode ser qualquer resíduo de aminoácido, exceto prolina (GAVEL e VON HEIJNE, 1990; CHUANG et al., 2012). O papel da porção de carboidratos na relação estrutura-função das SVSPs ainda não foi completamente compreendido. Em muitos casos, foi demonstrado que a N-glicosilação interfere na atividade catalítica dessas enzimas (COSTA et al., 2009). Zhu e colaboradores (2005) apontam que a diferença catalítica entre duas SVSPs de *Agkistrodon acutus* pode estar relacionada com carboidratos distintos ligados a resíduos próximos ao sítio ativo destas moléculas. Resultados semelhantes foram encontrados para uma SVSP de *B. jararacuçu*, a qual apresentou atividade 50% menor sobre o fibrinogênio quando deglicosilada (SANT'ANA et al., 2008). Entretanto, também há relatos que a glicosilação destas enzimas seja mais importante para a sua estabilidade do que para sua atividade catalítica (KOMORI e NIKAI, 1998).

#### 4.4. Obtenção das formas PEGladas da collineina-1 nativa e recombinante

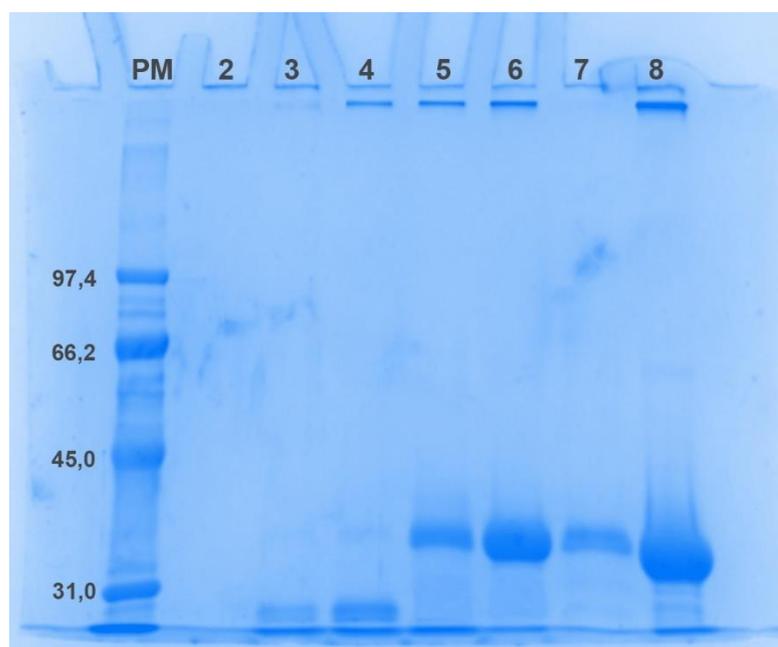
A técnica de PEGlação, processo que consiste na conjugação de cadeias de polietilenoglicol (PEG) a biomoléculas, é considerada promissora visando aumentar o potencial terapêutico e biotecnológico de peptídeos e proteínas (DA-SILVA-FREITAS et al., 2015; WAN, X. et al., 2017). Essencialmente, todas as proteínas utilizadas na terapêutica podem apresentar algum tipo de resposta imunológica, devida à sua natureza exógena ao organismo humano (GEFEN et al., 2013). Deste modo, visando a aplicação futura da collineina-1 como possível agente terapêutico, buscou-se a modificação química desta proteína com a PEGlação.

Para obter uma população mono-PEGlada da collineina-1 nativa e recombinante, isto é, a ligação de uma única molécula de mPEG-maleimide para cada molécula de proteína, foi utilizado o protocolo padronizado por DA-SILVA-FREITAS e colaboradores (2015), com modificações. Após a reação, realizou-se o processo de purificação das proteínas PEGladas, em sistema FPLC utilizando coluna de fase reversa C4.

No processo de purificação da collineina-1 nativa PEGlada (PEG-collineina-1, Fig. 36), foram obtidas três frações, denominadas P1 a P3. A fim de avaliar se a presença de mais de uma fração era devida a algum tipo de contaminação dos reagentes utilizados no processo, as três frações foram analisadas em gel de SDS-PAGE a 10% (Fig. 37).



**Figura 36. Perfil cromatográfico da PEG-collineina-1 em coluna de fase reversa C4.** Coluna de fase reversa C4 equilibrada com solução de TFA 0,1% (solução A), eluída com gradiente de concentração de acetonitrila (linha vermelha) até 100 % de solução B (ACN 80% + TFA 0,1%), sob vazão de 0,7 mL/min. Temperatura: 25°C. Volume coletado por tubo: 500  $\mu$ L.



**Figura 37. Perfil da SDS-PAGE (10%) das frações coletadas na cromatografia em fase reversa da PEG-collineina-1.** Corrida de 1,5 h a 110V, 8,0 mA, utilizando coloração com Coomassie Blue G250. **PM:** padrão de massas moleculares, com valores expressos em kDa. **2)** vazio; **3 e 4)** P1; **5 e 6)** P2; **7)** P3 **8)** collineina-1 nativa não-PEGlada.

As frações P2 e P3 apresentam massas semelhantes, conforme observado no gel de SDS-PAGE (Fig. 37). Não foram encontradas outras bandas nestas frações, o que indica a ausência

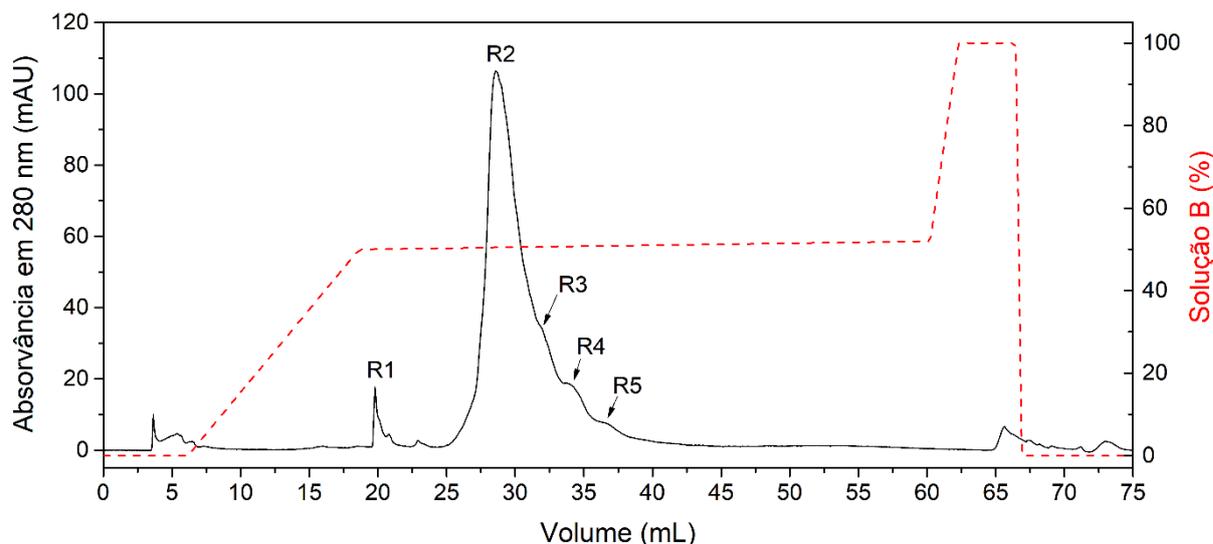
de contaminantes, encontrados na fração P1. A massa molecular apresentada pelas proteínas presentes nas frações P2 e P3 é maior do que aquela apresentada pela proteína nativa não-PEGlada, confirmando o processo de PEGlação desta enzima. De acordo com os dados de recuperação, apresentados na tabela 5, das frações P2 e P3, observa-se que o rendimento desta reação é de 70,6%.

**Tabela 5. Recuperação da collineína-1 nativa PEGlada nos passos cromatográficos utilizados para sua purificação.**

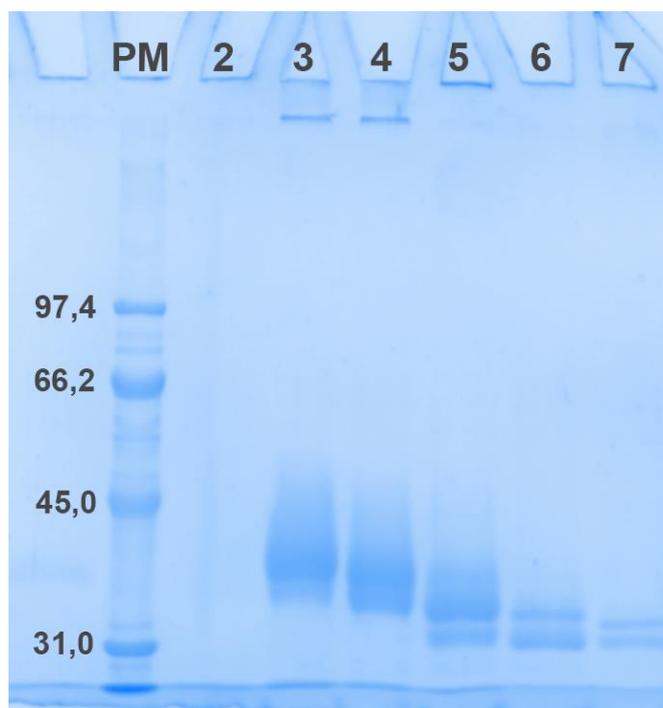
Passo cromatográfico	collineína-1 nativa PEGlada	
	Massa (mg)	Recuperação (%)
Meio reacional de PEGlação	1,00	100
RP-FPLC - Coluna C4 (P2+P3)	0,71	70,6

Após a PEGlação da proteína em sua forma nativa, seguiu-se para a obtenção da proteína recombinante PEGlada (PEG-rCollineína-1). Assim, foram realizados os mesmos procedimentos padronizados para a proteína nativa, devido às características estruturais comuns às duas moléculas.

No processo de purificação da PEG-rCollineína-1, foram obtidas cinco frações, designadas R1 a R5 (Fig. 38). A fim de avaliar se a presença de mais de uma fração era devida a algum tipo de contaminação dos reagentes utilizados no processo, as três frações foram submetidas à SDS-PAGE a 10% (Fig. 39).



**Figura 38. Perfil cromatográfico da collineina-1 recombinante PEGlada (PEG-rCollineina-1) em coluna de fase reversa C4.** Coluna equilibrada com solução de TFA 0,1% (solução A), eluída com gradiente de concentração de acetonitrila (linha vermelha) até 100% de solução B (ACN 80% + TFA 0,1%), sob vazão de 0,7 mL/min. Temperatura: 25°C. Volume coletado por tubo: 500  $\mu$ L.



**Figura 39. Perfil da SDS-PAGE (10%) das frações coletadas na cromatografia em fase reversa da PEG-rCollineina-1.** Corrida de 1,5 h a 110V, 8,0 mA, utilizando coloração com Coomassie Blue G250. PM: padrão de massas moleculares, com valores expressos em kDa. 2) R1; 3) R2; 4) R3; 5) R4; 6) R5; 7) rCollineina-1 não-PEGlada.

As frações R2 e R3 contêm a PEG-rCollineina-1, conforme dados obtidos na SDS-PAGE (Fig. 39). As massas moleculares apresentadas no gel de eletroforese mostram um aumento na massa molecular da proteína, confirmando, assim, seu processo de PEGlação. O rendimento desta reação é de 86,5%, de acordo com os dados de recuperação apresentados na tabela 6.

**Tabela 6. Recuperação da PEG-rCollineina-1 nos passos cromatográficos utilizados para sua purificação.**

Passo cromatográfico	collineina-1 recombinante PEGlada	
	Massa (mg)	Recuperação (%)
Meio reacional de PEGlação	1,00	100
RP-FPLC - Coluna C4 (R2+R3)	0,87	86,5

Nos últimos anos, peptídeos e proteínas têm se tornado alvos de estudo visando o tratamento de diversas patologias humanas. Entretanto, seus benefícios são limitados devido à facilidade de degradação, imunogenicidade, agregação, entre outros problemas. Desde a década de 1950, a modificação química de proteínas tornou-se uma prática comum, visando sua maior aplicabilidade terapêutica. Neste contexto, a PEGlação de proteínas surge como uma das práticas mais comuns, visando a redução da imunogenicidade e de seus problemas decorrentes (KODERA et al., 1998; MAIER et al., 2019).

Derivados de polietilenoglicol têm sido utilizados com sucesso para aprimorar as propriedades farmacológicas e farmacocinéticas de proteínas terapêuticas (GREENWALD et al., 2003; HOANG THI et al., 2020). O processo de PEGlação prolonga o tempo de circulação de biofármacos, uma vez que há o aumento do seu raio hidrodinâmico, assim como a redução no processo de filtração desses compostos nos rins (XUE et al., 2013). Além disso, observa-se um aumento da estabilidade das proteínas e a redução de sua imunogenicidade (PISAL et al., 2010).

Recentemente, diversas proteínas PEGladas foram aprovadas para uso clínico, incluindo o Esperoct<sup>®</sup> (fator VIII PEGlado), Oncaspar<sup>®</sup> (asparaginase PEGlada) e o Krystexxa<sup>®</sup> (uricase PEGlada) (SZLACHCIC et al., 2011; WYNN e GUMUSCU, 2016; WAN, X. et al., 2017). Estes biofármacos PEGlados apresentam maior eficácia terapêutica quando comparados com suas moléculas não PEGladas. Deste modo, esta técnica de bioconjugação tem sido considerada

como promissora no desenvolvimento de novos medicamentos (VERONESE e MERO, 2008; SANTOS et al., 2018).

Toxinas proteicas e peptídicas são consideradas uma fonte inestimável para o desenvolvimento de novos medicamentos, devido à sua habilidade de ligação em alvos específicos (ZHAN et al., 2015; BOLDRINI-FRANCA et al., 2017; MUNAWAR et al., 2018). Entretanto, apenas um estudo foi publicado, até o momento, envolvendo a PEGlação de toxinas de serpente, buscando uma possível aplicação terapêutica para SVSPs (DA-SILVA-FREITAS et al., 2015), o que reforça a necessidade de novos estudos nesta área.

## **4.5. Caracterização estrutural**

### **4.5.1. Avaliação da termoestabilidade**

O enovelamento de proteínas é um processo de organização molecular no qual um polipeptídeo, sem conformação definida, constitui-se em estrutura tridimensional biologicamente funcional. A compreensão dos mecanismos que levam a este fenômeno é de fundamental importância para a biologia e áreas afins. Além das propriedades intrínsecas das interações intraproteínas, o enovelamento de proteínas é afetado por fatores extrínsecos, como o ambiente de solvatação, incluindo a presença de sais e pH utilizado. Assim, alterações na classe do solvente podem levar a mudanças em vários aspectos fundamentais de estabilidade proteica (MATTOS e RINGE, 2001; CANCHI e GARCIA, 2013).

O processo de purificação de toxinas a partir de peçonhas animais é realizado em um ambiente desprovido de fatores potencialmente estabilizadores, como a presença de sais e outras proteínas encontradas na peçonha bruta (MUNEKIYO e MACKESSY, 1998). Neste contexto, não são raros os casos nos quais proteínas apresentam perda de função, além de estabilidade reduzida, em determinadas condições cromatográficas e soluções utilizadas em ensaios laboratoriais. Deste modo, é de extrema importância identificar os componentes e condições ideais de cada toxina, a fim de evitar e/ou recuperar a integridade e a atividade destas moléculas.

A caracterização de toxinas animais requer, muitas vezes, que estas sejam obtidas em quantidades que vão além daquela encontrada na peçonha, na sua forma nativa. Assim, a expressão heteróloga de proteínas, bem como a síntese de peptídeos em fase sólida, surgem como ferramentas essenciais na obtenção destes compostos. Entretanto, devido a diferentes

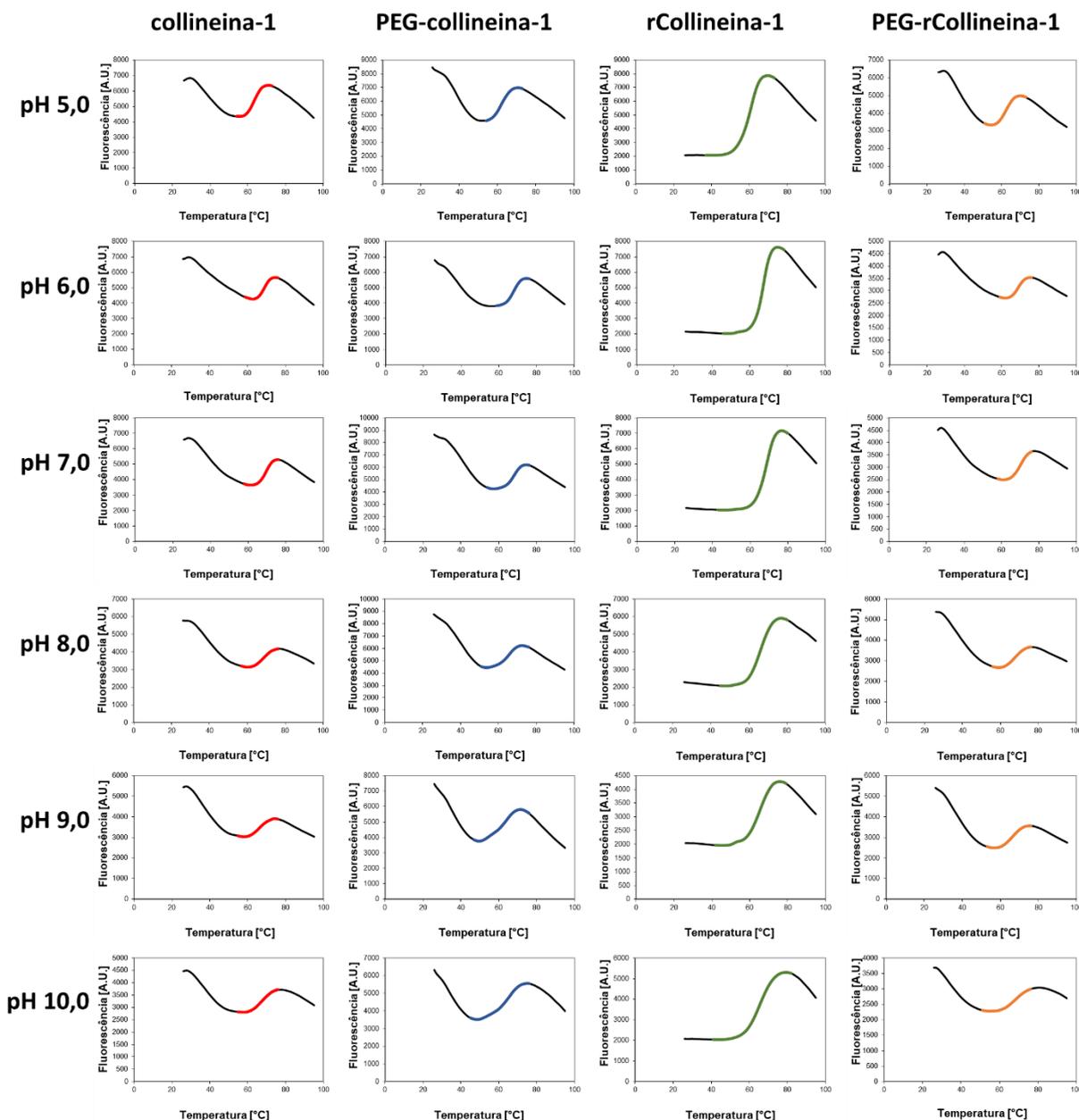
padrões de expressão, além de outros fatores intrínsecos a cada sistema utilizado, as proteínas recombinantes podem exibir características estruturais e funcionais disparens às aquelas apresentadas pelas suas formas nativas (PUXBAUM et al., 2015).

A PEGlação, caracterizada como uma técnica de bioconjugação, também pode conferir mudanças estruturais e funcionais importantes em proteínas e peptídeos PEGlados. Diversos trabalhos relatam ganho de atividade enzimática (MONFARDINI et al., 1995; FEDERICO et al., 2006), enquanto outros mostram atividades funcionais diferentes exibidas por proteínas PEGladas, quando comparadas às suas formas nativas (PRADHANANGA et al., 2002).

Diante ao exposto, torna-se essencial a caracterização estrutural de todas as formas da proteína alvo deste trabalho, visto que se emprega uma proteína nas suas formas nativa, recombinante e PEGlada. Com esta caracterização, buscou-se avaliar se a expressão recombinante da collineína-1, bem como a sua PEGlação, interfere na sua termoestabilidade.

O ensaio de estabilidade térmica baseado em fluorescência, (*Thermal Shift Assay*, ou *Thermofluor*<sup>®</sup>), baseia-se no uso de componentes que fluorescem a partir da interação com regiões hidrofóbicas de proteínas, que são expostas quando estas desnaturam e perdem sua conformação original (BOIVIN et al., 2013). A intensidade da fluorescência é plotada em função da temperatura, gerando uma curva sigmoideal que pode ser descrita por uma transição de dois estados (NIESEN et al., 2007). É importante enfatizar que este trabalho é pioneiro no uso desta técnica na caracterização da termoestabilidade de SVSPs, bem como na influência de solventes orgânicos em sua estrutura terciária. Assim, as quatro formas da enzima, (collineína-1, PEG-collineína-1, rCollineína-1 e PEG-rCollineína-1) foram submetidas à avaliação de termoestabilidade, em diferentes soluções tampão, em uma faixa de pH de 5,0 a 10,0.

Em um primeiro momento, torna-se essencial destacar os dados de fluorescência obtidos por cada forma da enzima. Em todas as condições testadas, a collineína-1, PEG-collineína-1 e PEG-rCollineína-1 apresentaram valores elevados de fluorescência no início do experimento, revelando a presença de regiões hidrofóbicas expostas na superfície da proteína, característica não compartilhada pela rCollineína-1 (Fig. 40). Este cenário correlaciona-se com as metodologias de purificação empregadas para cada forma da enzima. Enquanto a rCollineína-1 é isolada a partir de cromatografias de afinidade e troca iônica, as outras formas da enzima são purificadas a partir de passos cromatográficos em fase reversa, utilizando acetonitrila para a eluição dos componentes.



**Figura 40.** Perfis de curva de termoestabilidade da collineina-1, PEG-collineina-1, rCollineina-1 e PEG-rCollineina-1, em diferentes condições (pH 5,0 a 10,0). As cores em destaque indicam o intervalo utilizado para o cálculo do ponto de inflexão, indicando a temperatura na qual a proteína perde a sua estrutura terciária. Os gráficos ilustram os efeitos obtidos em uma série de três experimentos independentes (n=3).

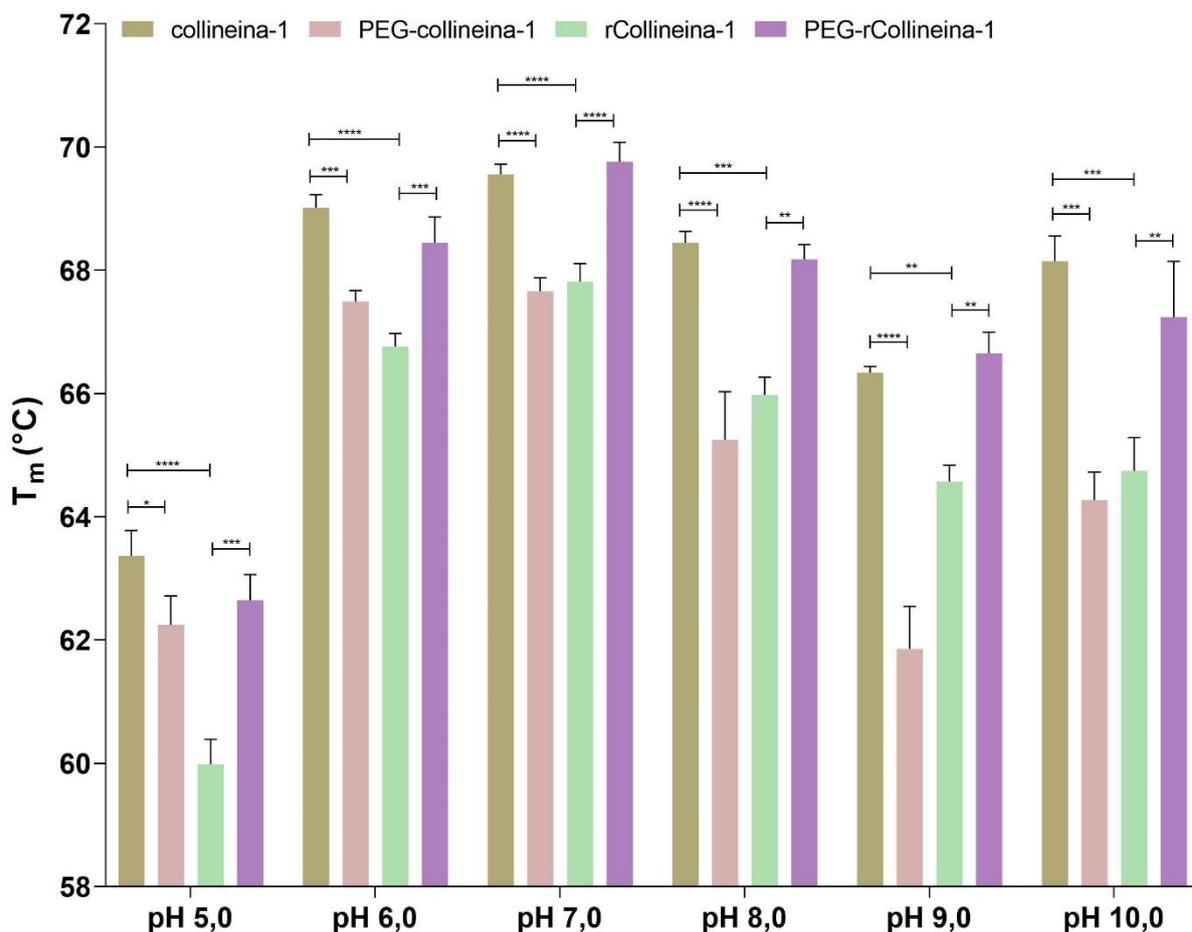
As condições drásticas decorrentes do uso de solventes orgânicos causam a diminuição do número de moléculas de água na primeira camada de solvatação de proteínas e peptídeos. Consequentemente, as cadeias laterais dos aminoácidos polares se tornam mais rígidas, optando por realizar interações intramoleculares com outros resíduos, e não com o solvente. A reorientação destes resíduos, da superfície para o interior, aumenta o número total de ligações

de hidrogênio e pontes salinas dentro da estrutura, tornando-a mais inflexível quando comparada à situação na presença de solventes polares. Em contraste, as cadeias laterais de aminoácidos não polares se tornam mais flexíveis, podendo levar à sua exposição na superfície da proteína. Estas alterações podem causar modificações estruturais significativas na conformação de determinadas proteínas, interferindo diretamente na estabilidade da estrutura (WHITLEY et al., 1994; MCNAY et al., 2001; SOARES et al., 2003; YANG et al., 2004).

Devido à alta fluorescência inicial observada nas formas da collineina-1 purificadas em fase reversa, pressupõe-se que o uso de solvente orgânico apolar contribuiu para que ocorressem mudanças estruturais dentro do contexto apresentado anteriormente. Estes resultados correlacionam-se, também, com os dados obtidos nos ensaios de dicroísmo circular (item 4.5.4) e cinética enzimática (item 4.6.1), nos quais os dados estruturais e funcionais, respectivamente, diferiram entre a rCollineina-1 e as outras formas da enzima (collineina-1, PEG-collineina-1 e PEG-rCollineina-1). Comparando-se os dados obtidos pelas quatro formas da enzima (Fig. 41), nota-se que todas apresentam temperaturas semelhantes de desenovelamento, indicando uma semelhança nos parâmetros de estabilidade. No conjunto analisado, o pH 5,0 foi a condição que apresentou menor estabilidade, enquanto o pH 7,0 apresentou maiores temperaturas de desenovelamento, evidenciando uma maior estabilidade para todas as formas da proteína (Tab. 7).

**Tabela 7. Temperatura de desenovelamento (°C) da collineina-1, PEG-collineina-1, rCollineina-1 e PEG-rCollineina-1, em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e Tris-HCl 50 mM (pH 7,0).**

Condição	collineina-1	PEG-collineina-1	rCollineina-1	PEG-rCollineina-1
<b>pH 5,0</b>	63,4 ± 0,4	60 ± 0,4	62,2 ± 0,5	62,6 ± 0,4
<b>pH 7</b>	69,6 ± 0,2	67,8 ± 0,3	67,7 ± 0,2	69,8 ± 0,3



**Figura 41. Efeito de diferentes condições na termoestabilidade da collineina-1, PEG-collineina-1, rCollineina-1 e PEG-rCollineina-1.** As amostras (0,25 mg/mL) foram aquecidas de 25 a 95 °C, com aumentos graduais de 1 °C e espera de 1 min/ponto. As amostras foram monitoradas através do sinal de fluorescência do corante SYPRO® orange (492/610 nm) (Invitrogen®, Carlsbad, California, EUA). Resultados apresentados como média ± SD; SD: desvio padrão. \* p<0,01, \*\* p<0,001, \*\*\* p<0,005, \*\*\*\* p<0,0001.

Com relação ao processo de PEGlação, os resultados apontam para a manutenção da termoestabilidade das proteínas nativa e recombinante após a bioconjugação ao polietilenoglicol, com pequenas variações na termoestabilidade (Tab. 8). Interessantemente, a PEGlação interferiu de maneira negativa na termoestabilidade da collineina-1, sendo que esta variação é mais evidente em pHs básicos. Por outro lado, a PEGlação da rCollineina-1 aumentou a termoestabilidade desta forma da enzima, embora de maneira mais sutil, com variações semelhantes em todas as faixas de pH analisadas.

**Tabela 8. Valores de  $\Delta T_m$  relacionando a estabilidade das formas PEGladas e não-PEGladas da collineina-1 nativa e recombinante, em diferentes valores de pH.**

Condição	collineina-1/PEG-collineina-1	rCollineina-1/PEG-rCollineina-1
	$\Delta T_m$	$\Delta T_m$
<b>pH 5,0</b>	-1,1	2,7
<b>pH 6,0</b>	-1,5	1,7
<b>pH 7,0</b>	-1,9	1,9
<b>pH 8,0</b>	-3,2	2,2
<b>pH 9,0</b>	-4,5	2,1
<b>pH 10,0</b>	-3,9	2,5

Supõe-se que estas variações nos valores de  $\Delta T_m$  encontradas nas formas nativa e recombinante da collineina-1 também estejam relacionadas às alterações estruturais, decorrentes dos diferentes processos de purificação empregados no isolamento destas moléculas. Embora pequena, é importante enfatizar que a PEGlação da rCollineina-1 causou uma alteração positiva na termoestabilidade desta forma da enzima, característica diretamente relacionada com a preservação de sua estrutura terciária, fator importante associado à sua possível aplicação terapêutica.

A PEGlação tem sido extensivamente utilizada como ferramenta para aumentar a estabilidade térmica de proteínas. Resultados semelhantes aos da rCollineina-1 e PEG-rCollineina-1 foram reportados na literatura, incluindo a citocina IFN $\alpha$  (POPP et al., 2011), *NEL-like molecule-1* (ZHANG et al., 2014), lisozima (LEE et al., 2015), Adnectin e CT-322 (PALM et al., 2011), as quais também apresentaram aumento nos parâmetros de termoestabilidade após o processo de bioconjugação a derivados de polietilenoglicol.

Em trabalhos anteriores, foi demonstrado que a forma nativa da collineina-1 mantém sua atividade esterásica sobre o substrato TAME mesmo após submetida a uma temperatura de 100 °C (BOLDRINI-FRANCA et al., 2015). As enzimas trombina-símile apresentam em sua estrutura doze resíduos de cisteína, envolvidos em seis ligações dissulfeto intramoleculares (VALERIANO-ZAPANA et al., 2012), responsáveis por estabilizar a estrutura terciária destas proteínas. A presença destas ligações pode ter participação na elevada termoestabilidade apresentada pela enzima, característica observada em outras enzimas da mesma classe, de diferentes serpentes (GHORBANPUR et al., 2009; MENALDO et al., 2012; ZAQUEO et al., 2014).

Diversos estudos apontam que as alterações provocadas pela PEGlação, especialmente na solvatação da superfície da proteína, desempenham um papel fundamental na estabilidade conformacional de proteínas. No presente estudo, a conjugação de mPEG-maleimide às formas nativa e recombinante da collinena-1 não causou alterações significativas em sua termoestabilidade. Ademais, destaca-se que a PEG-rCollinena-1 é uma das formas que apresenta maior temperatura de desnovoelamento em todas as condições testadas, demonstrando alta estabilidade, elemento importante no avanço desta molécula como um potencial biofármaco.

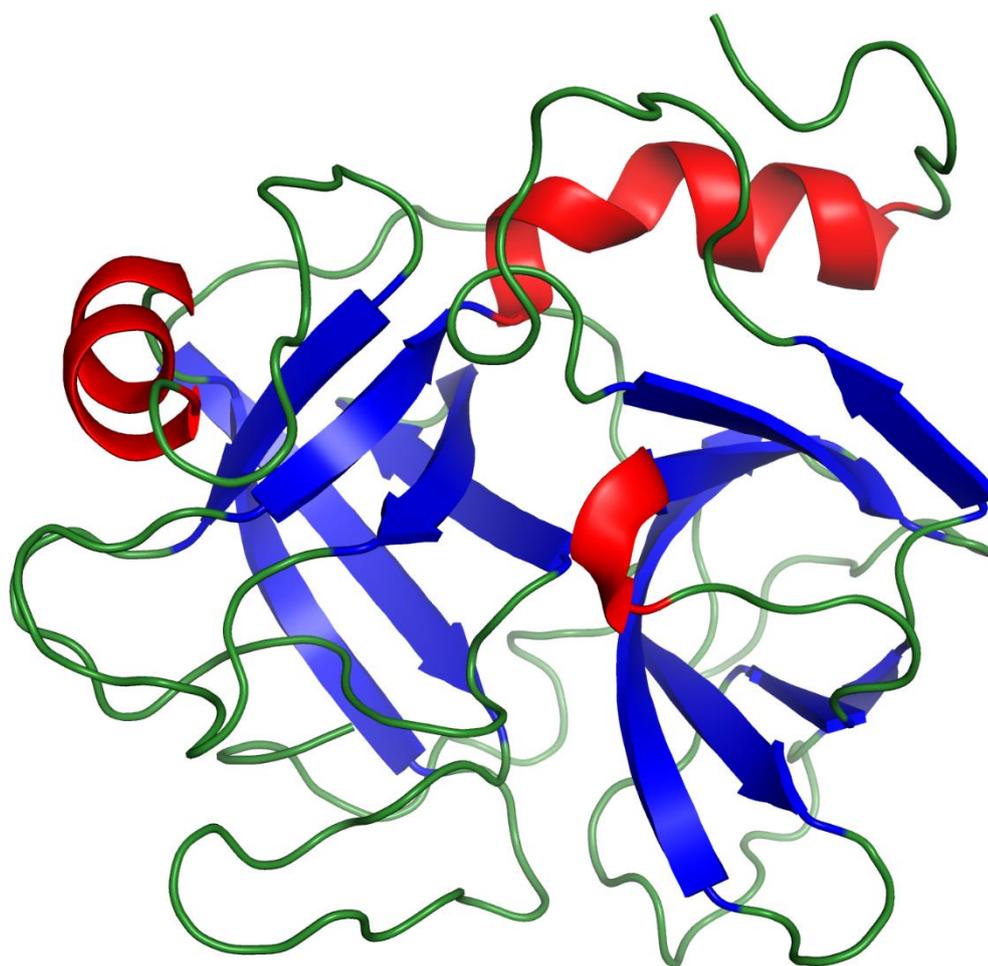
#### 4.5.2. Modelagem molecular

As peçonhas de serpentes, especialmente aquelas pertencentes à família Viperidae, contêm uma variedade de enzimas proteolíticas, sobretudo serino- e metaloproteases, que apresentam similaridade estrutural com enzimas das mesmas classes, encontradas em mamíferos. Como consequência, elas podem interferir em diversos efeitos fisiológicos, causando sintomas que são observados durante o quadro de envenenamento por estas espécies (ZELANIS et al., 2015).

Atualmente, apenas cinco estruturas de SVSPs foram determinadas: Jararacussin-I, (*B. jararacuçu*), código PDB: 4GSO (ULLAH et al., 2013); Da-36 e AaV-SP-I (*Deinagkistrodon acutus*), código PDB: 5XRF e 1OPO, respectivamente (ZHU et al., 2005); TSV-PA, (*Trimeresurus stejnegeri*), código PDB: 1BQY (PARRY, M. A. et al., 1998) e ativador de proteína C (*Agkistrodon contortrix contortrix*), código PDB: 2AIP (MURAKAMI e ARNI, 2005). Todavia, elas são modelos importantes para a modelagem de outras proteínas semelhantes, pertencentes à mesma classe estrutural (SERRANO, 2013). De modo geral, a estrutura das serinoproteases encontradas em peçonhas de serpentes é semelhante àquelas das enzimas quimotripsina-símile, na qual o sítio ativo está localizado na junção dos seis conjuntos de folhas beta, denominado de beta-barril (*six stranded beta-barrels*), além da presença de cinco ou seis ligações dissulfeto (PARRY, M. A. A. et al., 1998).

Estudos que buscam a determinação da estrutura destas proteínas são importantes no âmbito clínico, uma vez que a caracterização destas moléculas auxilia no sucesso do tratamento dos acidentes ofídicos. Ademais, a extensiva caracterização destas biomoléculas é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias para distúrbios do sistema hemostático.

A determinação teórica da estrutura da collineina-1 (Fig. 42) foi realizada através de modelagem molecular, com auxílio da ferramenta *online* SWISS-MODEL, utilizando como suporte estruturas cristalográficas de serinoproteases já depositadas em bancos de dados. O objetivo deste estudo prévio foi comparar a estrutura da collineina-1 com a estrutura de outras SVSPs e estimar possíveis diferenças no enovelamento da proteína. A molécula molde, empregada pelo programa para prever a estrutura da collineina-1, foi uma serinoprotease trombina-símile da espécie *D. acutus* (código de acesso ao PDB 5XRF), a qual apresenta uma similaridade de 61,28% com a collineina-1. Essa estrutura foi resolvida a partir métodos cristalográficos, a uma resolução de 2,20 Å.

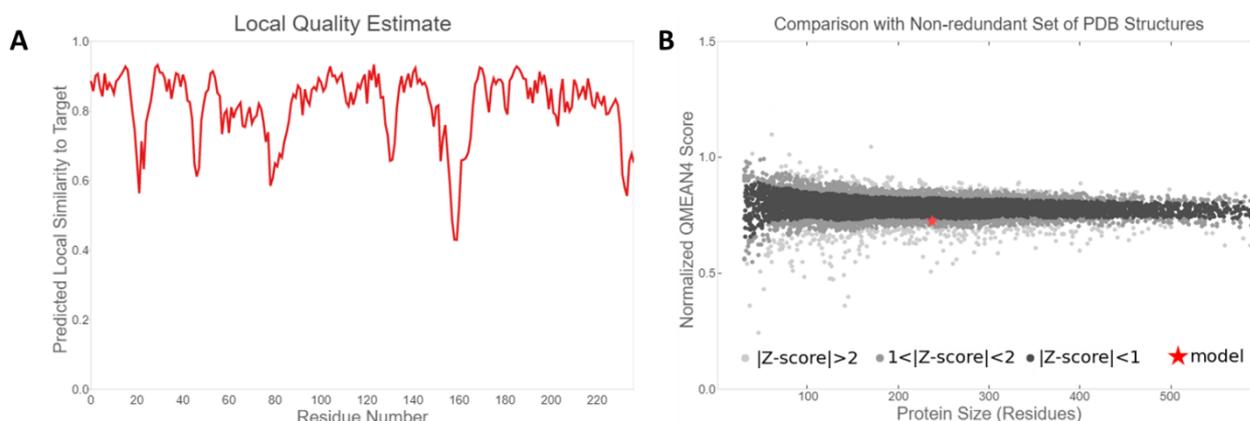


**Figura 42. Estrutura de modelagem molecular da collineina-1.** Modelo estrutural obtido utilizando a ferramenta *online* SWISS-MODEL. A estrutura foi colorida de acordo com o tipo de estrutura secundária: vermelho para alfa-hélices, azul para folhas beta e verde para voltas e outros elementos.

A fim de avaliar a qualidade do modelo apresentado, utilizou-se os índices GMQE e QMEAN, disponibilizadas pela ferramenta. A primeira, denominada estimativa da qualidade

global do modelo (*Global Model Quality Estimation*), é um cálculo que combina as propriedades do alinhamento do alvo com o modelo empregado. A pontuação resultante é expressa como um número entre 0 e 1, refletindo a precisão esperada da estrutura construída com o alinhamento à molécula-molde. Desta forma, números mais altos indicam maior confiabilidade. O QMEAN é um índice elaborado com base em diferentes propriedades geométricas e fornece estimativas de qualidade absoluta global (para toda a estrutura) e local (por resíduo), com base em um único modelo. As pontuações próximas a zero indicam concordância satisfatória entre a estrutura do modelo e as estruturas experimentais de tamanho semelhante. Pontuações de -4 ou abaixo indicam modelos com baixa qualidade (BENKERT et al., 2011).

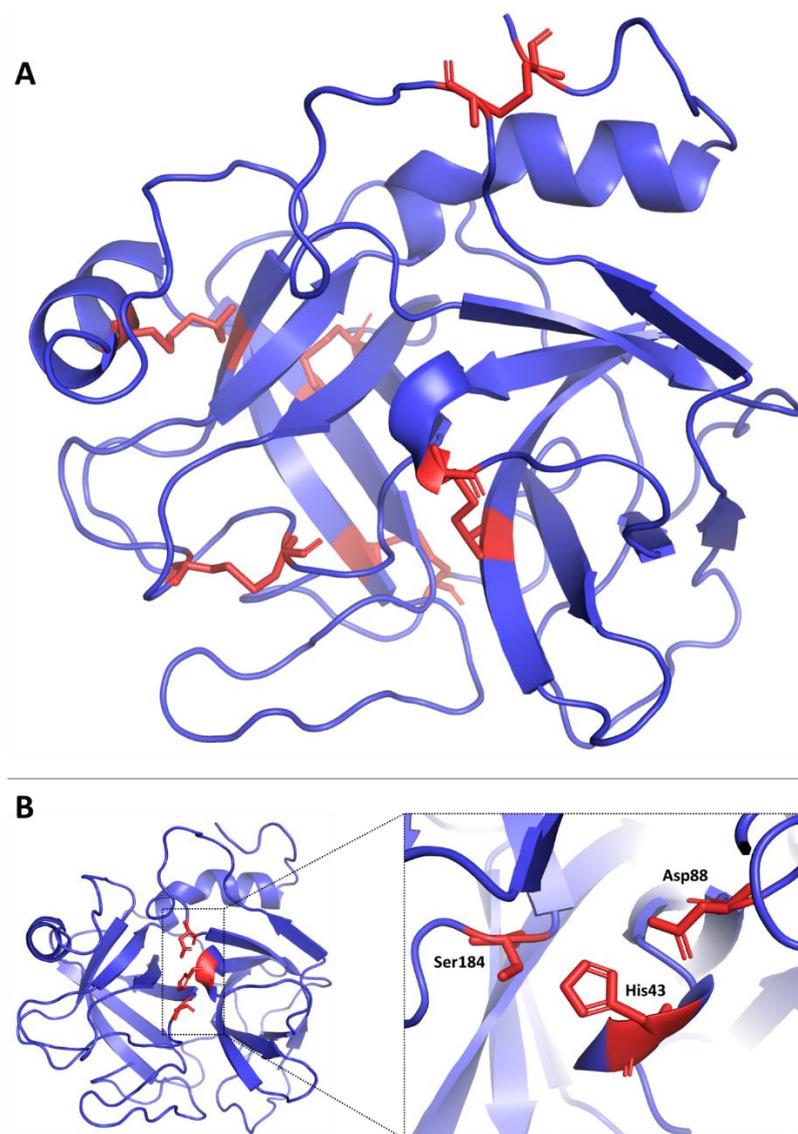
O modelo proposto para a collineina-1 apresentou valor de GMQE de 0,82 e valor global de QMEAN de -1,27, indicando boa qualidade do resultado obtido. A figura 43 indica a estimativa de qualidade por resíduo (painel A), além da comparação com outras estruturas presentes no banco de dados PDB, com valor de QMEAN normalizado (painel B).



**Figura 43. Índices de qualidade apresentados pela ferramenta *online* SWISS-MODEL.** (A) Estimativa de qualidade de cada resíduo da molécula; (B) Comparação do valor de QMEAN do modelo proposto com valores normalizados de QMEAN de estruturas depositadas no banco de dados PDB.

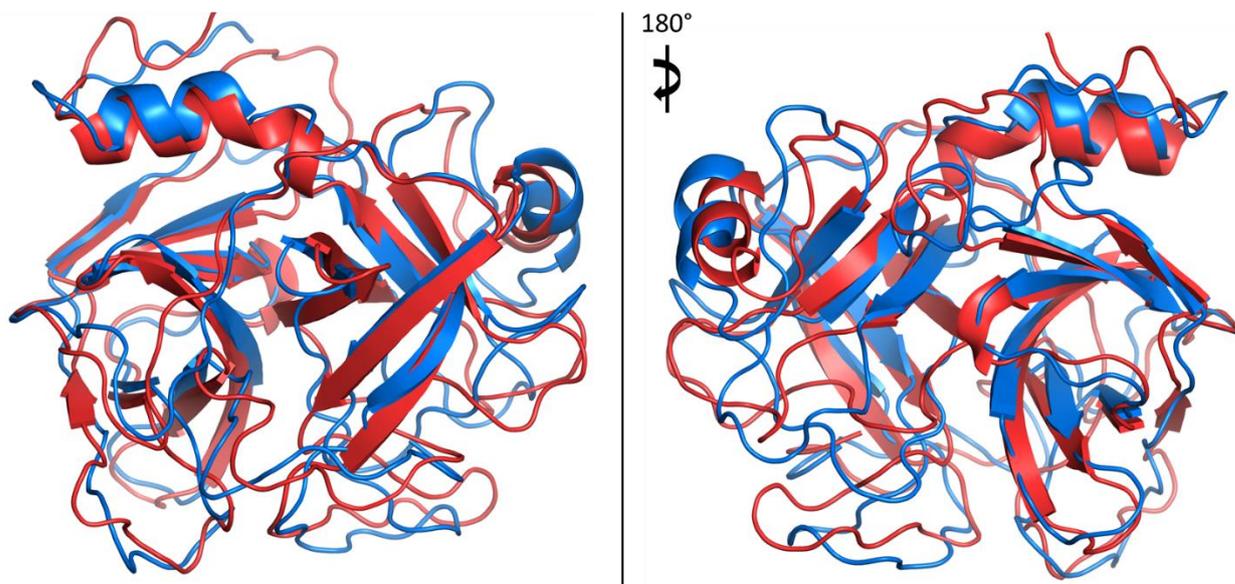
Quando alinhada com outras serinoproteases (PARRY, M. A. et al., 1998; MURAKAMI e ARNI, 2005; ZHU et al., 2005), com os códigos no PDB 1BQY [*Plasminogen activator* (TSV-PA), da espécie *Trimeresurus stejnegeri*], 2AIP (*native protein C activator*, da espécie *A. contortrix contortrix*) e 1OP0 (SVSP AaV-SP-I, da espécie *A. acutus*), respectivamente, a collineina-1 apresenta similaridade superior a 60% com essas estruturas. Estas moléculas apresentam, como principal característica estrutural, a tríade catalítica

composta pelos resíduos de serina, histidina e ácido aspártico, destacados na estrutura da collineína-1 (Fig. 44, painel B). O resíduo de serina, responsável pela formação do complexo transitório acil-enzima, é estabilizado pelos outros dois resíduos da tríade. Ademais, o modelo proposto da collineína-1 também conta com a presença de seis ligações dissulfeto (Fig. 44, painel A), atributo único das SVSPs trombina-símile (SERRANO e MAROUN, 2005).



**Figura 44.** (A) Estrutura de modelagem molecular da collineína-1 com destaque para os resíduos de cisteína envolvidos em ligações dissulfeto intramoleculares. (B) Destaque para os resíduos do sítio catalítico. A estrutura em evidência foi aproximada e rotacionada em 90°, para melhor visualização dos resíduos em questão. A proteína foi colorida em azul, enquanto os resíduos em destaque estão marcados em vermelho.

A fim de procurar outras formas de sustentar o modelo proposto pelo SWISS-MODEL, alinhou-se a estrutura de modelagem molecular obtida neste trabalho com a modelagem realizada para a construção do *docking* molecular da collineina-1 com o canal iônico hEAG1, (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2020). Ao analisar os dados obtidos (Fig. 45), nota-se significativa similaridade entre as estruturas, dando maior credibilidade ao modelo proposto.



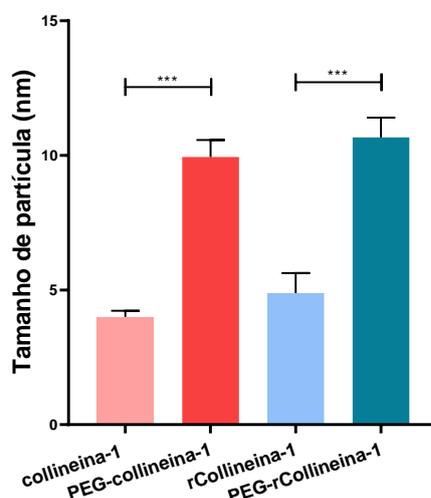
**Figura 45.** Sobreposição das estruturas obtidas por modelagem molecular no SWISS-MODEL (em vermelho) e nos estudos de *docking* molecular (em azul). As estruturas foram sobrepostas utilizando o programa PyMol 2.3.4.

A modelagem molecular é uma poderosa metodologia para analisar a estrutura tridimensional de macromoléculas com aplicação terapêutica e biotecnológica. É, muitas vezes, o primeiro passo para a caracterização estrutural destas proteínas. Assim, a obtenção da estrutura teórica da collineina-1 é um primeiro passo para a sua caracterização estrutural, oferecendo detalhes estruturais que podem ser empregados futuramente na compreensão do comportamento *in vivo* desta molécula.

#### 4.5.3. Determinação do tamanho de partícula através da técnica de DLS

A técnica de DLS é empregada para detectar agregados em soluções de macromoléculas, além de fornecer o tamanho aproximado de proteínas, ácidos nucleicos e outros compostos em

solução (LORBER et al., 2012). Através desta metodologia, foi possível determinar o índice de polidispersividade em solução da collineína-1, PEG-collineína-1 e rCollineína-1 (Fig. 46).



**Figura 46. Tamanho de partícula das diferentes formas da enzima.** Collineína-1:  $4,0 \pm 0,4$  nm; PEG-collineína-1:  $9,9 \pm 1,1$  nm, rCollineína-1:  $4,9 \pm 1,3$  nm e PEG-rCollineína-1:  $10,7 \pm 1,3$  nm. Experimento realizado em triplicata, a 18 °C. Resultados apresentados como média  $\pm$  SEM; SEM: desvio padrão da média. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

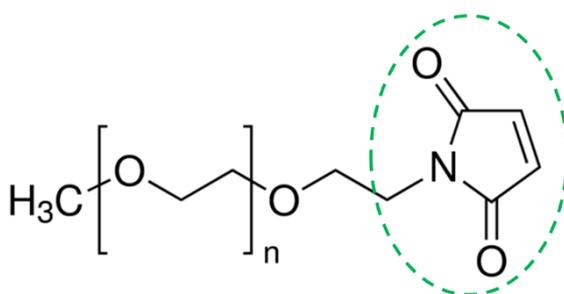
A rCollineína-1 apresentou uma população com tamanho de partícula aproximado de 49 Å um aumento de 9 Å quando comparado à collineína-1 (40 Å). Acredita-se que este aumento seja devido, primariamente, a dois fatores: **1)** os 27 resíduos de aminoácidos adicionais, inseridos no processo de clonagem e expressão da rCollineína-1 (epítipo *myc* e a cauda de poli-histidina) e/ou **2)** o conteúdo de carboidratos presente na enzima recombinante, que é maior do que aquele presente na proteína nativa. Assim, esses fatores podem expandir o tamanho da proteína, sendo condizente com o acréscimo de 9 Å observado pela molécula recombinante.

A PEGlação da collineína-1 nativa e recombinante aumentou consideravelmente o tamanho da proteína em solução (Fig. 46). As proteínas não-PEGladas apresentam diâmetro entre 40-50 Å, compatível com o tamanho de uma proteína globular na faixa de 30-50 kDa (ERICKSON, 2009). Por outro lado, após a PEGlação, as proteínas exibem diâmetro de aproximadamente 100 Å, demonstrando assim o aumento do raio hidrodinâmico das proteínas conjugadas ao derivado de polietilenoglicol.

Os derivados de polietilenoglicol são moléculas que apresentam alto grau de hidrofiliçidade, atraindo moléculas de água ao seu redor. Este fenômeno, quando associado às

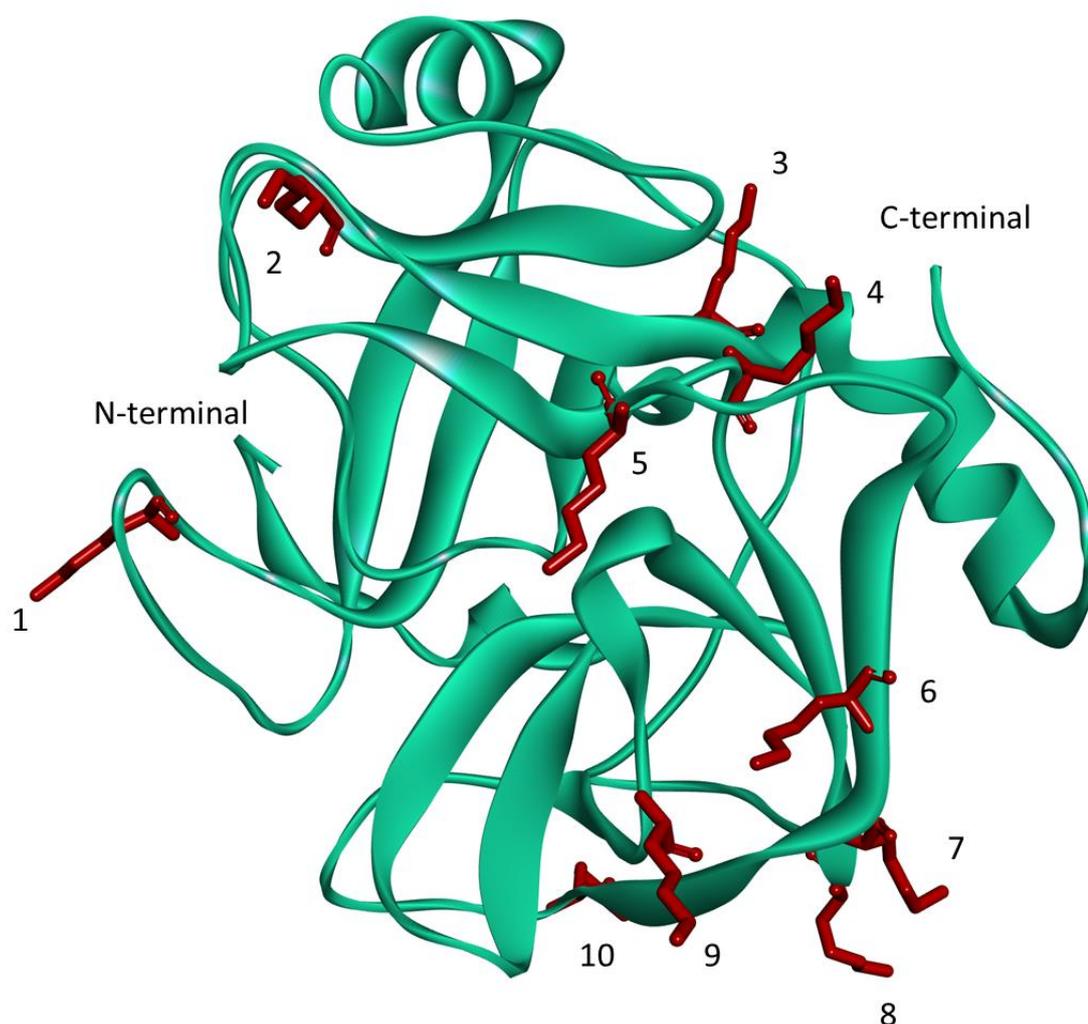
proteínas, aumenta sua solubilidade, além de aumentar o seu raio hidrodinâmico, um dos fatores responsáveis pela diminuição da imunogenicidade e da degradação de proteínas PEGladas (TURECEK et al., 2016).

O mPEG-maleimide, molécula utilizada para a PEGlação da collineina-1, apresenta massa molecular de 5 kDa, caracterizada como uma molécula de cadeia simples, sem ramificações (Fig. 47). O grupo maleimide, destacado na figura, é responsável pela ligação à cadeia lateral dos resíduos de lisina da proteína, interagindo com o grupamento amina da cadeia lateral deste aminoácido.



**Figura 47. Molécula do derivado de PEG *methoxypolyethylene glycol maleimide*.** Destaque: grupo maleimide, responsável pela conjugação aos resíduos de cisteína e/ou lisina de peptídeos e proteínas. Molécula desenhada pelo autor, utilizando o programa ChemDraw 9.1

A collineina-1 apresenta dez possíveis sítios de PEGlação, em consequência da presença de dez resíduos de lisina em sua estrutura (Fig. 48). De forma geral, esses resíduos encontram-se na superfície da proteína, acessíveis para a reação de conjugação ao mPEG-maleimide. Estudos posteriores são necessários a fim de determinar em qual resíduo de lisina a PEGlação está ocorrendo nas formas nativa e recombinante da enzima.



**Figura 48.** Estrutura de modelagem da collineina-1 nativa com os possíveis sítios de PEGlação destacados. Aminoácidos destacados em vermelho: lisina – prováveis sítios de ligação ao mPEG-maleimide.

Diferentes medicamentos PEGlados, já disponíveis no mercado (Tab. 1), também apresentam sítios inespecíficos de PEGlação, como o Adagen<sup>®</sup>, Oncaspar<sup>®</sup>, PegIntron<sup>®</sup>, Pegasys<sup>®</sup>, Somavert<sup>®</sup>, Mircera<sup>®</sup> e Krystexxa<sup>®</sup> (DOZIER e DISTEFANO, 2015; SANTOS et al., 2018). Esta inespecificidade do sítio de PEGlação não é uma limitação para o avanço da caracterização de novos fármacos, desde que se mostre que a conjugação ao polietilenoglicol não reduz a atividade do medicamento nem causa efeitos adversos no contexto clínico.

#### 4.5.4. Avaliação do conteúdo de estruturas secundárias

Os avanços recentes na área de bioinformática, além do crescimento da área de biologia estrutural, deu-se graças ao advento de técnicas de DNA recombinante, as quais permitiram que diferentes proteínas fossem obtidas em quantidades suficientes para sua caracterização (KHAN et al., 2016). Entretanto, torna-se essencial a obtenção de dados estruturais nas condições em que as proteínas realmente exercem a sua função, o que ocorre geralmente em solução (KELLY et al., 2005). Neste contexto, a técnica de dicroísmo circular é uma excelente ferramenta para a determinação de estruturas secundárias e enovelamento de proteínas em solução, obtidas utilizando técnicas de expressão heteróloga ou purificadas a partir de diferentes tecidos ou glândulas (GREENFIELD, 2006; CHAKRABORTY e LENTZ, 2012).

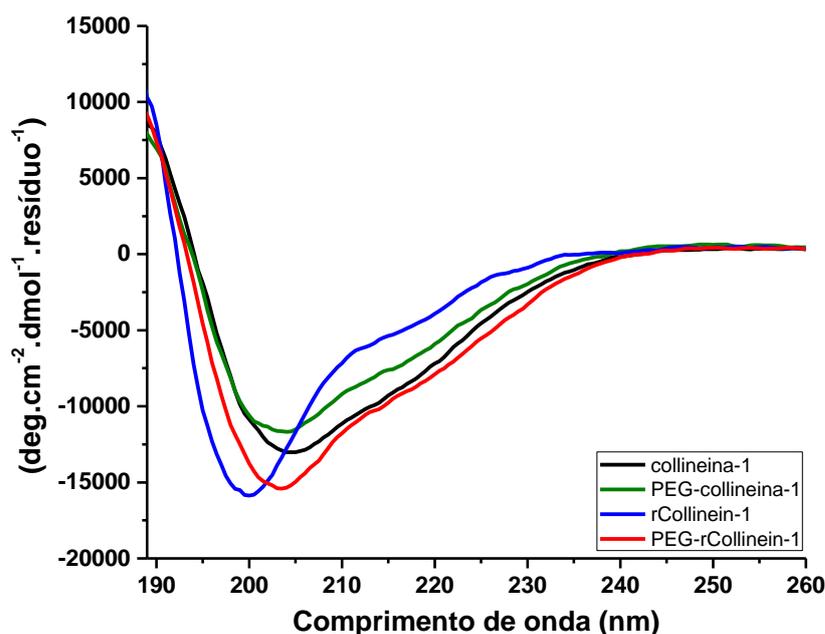
A determinação do conteúdo de estruturas secundárias foi obtida para as quatro formas da enzima (collineína-1, PEG-collineína-1, rCollineína-1 e PEG-rCollineína-1). A enzima recombinante, obtida através da expressão em *P. pastoris*, apresenta 27 resíduos adicionais em sua estrutura, referentes ao epítopo *cmc* e à cauda de poli-histidina. Além disso, a glicosilação efetuada por este tipo de levedura é diferente daquela realizada pela maquinaria celular da glândula de peçonha (BRETTHAUER e CASTELLINO, 1999), o que também pode alterar a conformação estrutural da proteína.

Adicionalmente, a PEGlação é uma alteração estrutural na proteína, visto que conjuga a ela um derivado de polietilenoglicol. Assim, este tipo de modificação apresenta o potencial de modificar a sua conformação, tanto da forma nativa quanto recombinante, podendo levar até à sua desnaturação ou perda de atividade catalítica, em casos extremos, dependendo do local onde ocorre a PEGlação.

Diante ao exposto, o entendimento dos possíveis efeitos da PEGlação, assim como a comparação estrutural entre as enzimas nativa e recombinante, tornam-se essenciais para a caracterização estrutural destas proteínas. Para a determinação do conteúdo de estruturas secundárias, foi feita uma varredura entre os comprimentos de onda de 185 a 260 nm, com as proteínas em concentrações próximas a 0,3 mg/mL (Tab. 9). Avaliou-se, neste intervalo, o desvio de luz polarizada pelas estruturas, com um espaço de 0,5 nm entre cada leitura (Fig. 49).

**Tabela 9. Concentrações das amostras utilizadas na análise de dicroísmo circular.**

Proteína	Concentração (mg/mL)
collineina-1	0,30
PEG-collineina-1	0,29
rCollineina-1	0,28
PEG-rCollineina-1	0,25

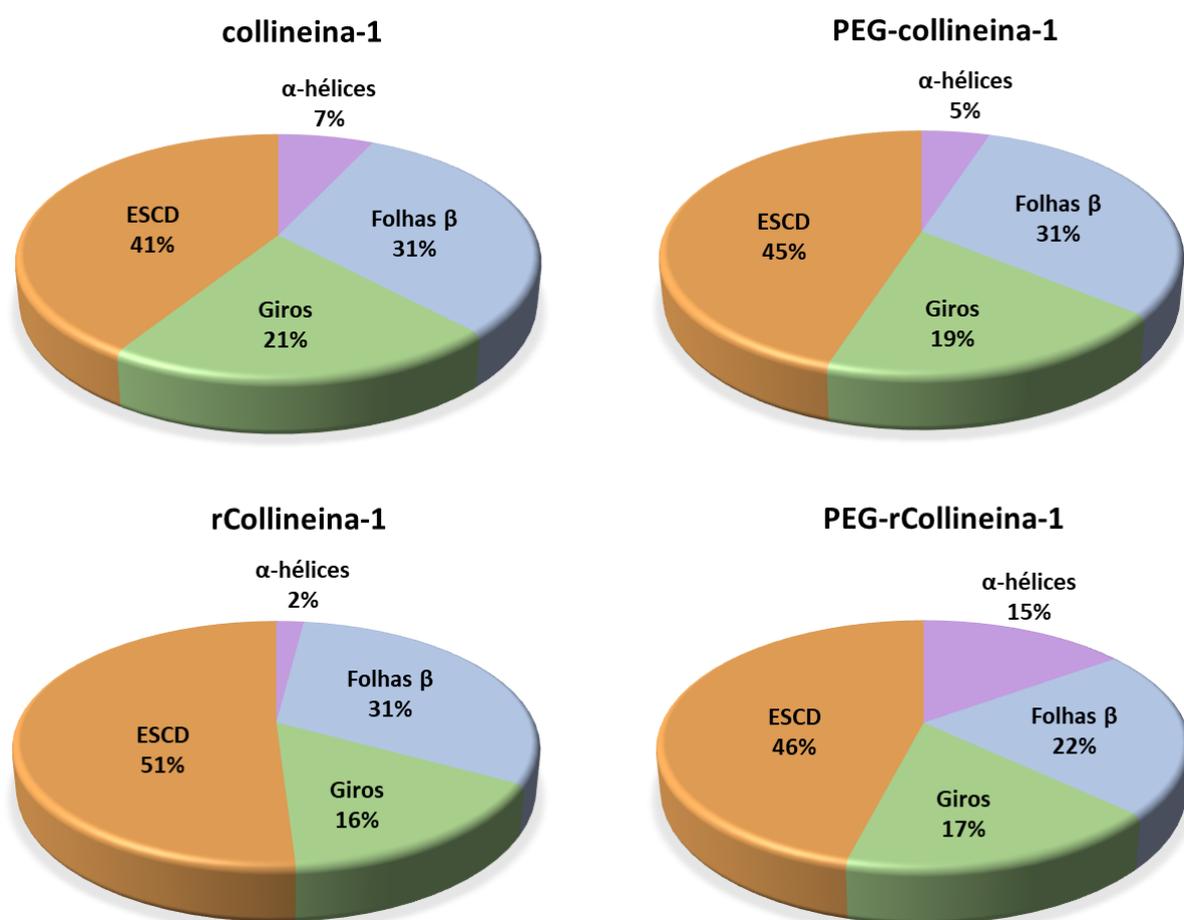


**Figura 49. Espectros de dicroísmo circular obtidos para as quatro formas da enzima.** Intervalo de 185 a 260 nm. Dados gerados a partir de 20 acumulações para cada proteína. Temperatura: 20 °C.

Observando os espectros obtidos da proteína nativa e recombinante, fica evidente a predominância de elementos sem conformação definida (ESCD), compatível com dados encontrados em estudos de dicroísmo circular de uma serinoprotease trombina-símile de *B. jararacussu* (GUEDES et al., 2008) e de duas enzimas da mesma classe, da peçonha de *A. actus* (ZHU et al., 2005). Estes elementos apresentam valores maiores que aqueles esperados para uma proteína pertencente à classe das quimotripsinas. Entretanto, quando se compara todos os elementos de estrutura secundária, os espectros tornam-se semelhantes às proteínas pertencentes a esta classe (GREENFIELD e FASMAN, 1969; JIBSON et al., 1981).

Após a deconvolução de cada espectro, observa-se pequenas alterações nas estruturas secundárias das diferentes formas da proteína (Fig. 50). A PEG-collineina-1 apresentou uma

diminuição no conteúdo de alfa-hélices e giros, quando comparada à collineina-1, mantendo, entretanto, o conteúdo de folhas beta. As diferenças entre esses elementos refletiram em um aumento de 4% no percentual de elementos sem conformação definida na PEG-collineina-1. Por outro lado, essas diferenças não são significativas a ponto de afetar a estrutura da proteína PEGlada, uma vez que a proporção entre esses elementos apresentou alteração mínima (2% para as alfa-hélices e 2% para os giros).



**Figura 50. Comparação entre o conteúdo de estrutura secundária da collineina-1 nativa, recombinante e suas formas PEGladas.** A deconvolução do espectro de cada forma da proteína foi realizada empregando-se a ferramenta *online* DichroWeb. ESCD: Elementos sem conformação definida.

Algumas alterações foram encontradas comparando-se as formas não-PEGlada e PEGlada da rCollineina-1. Observa-se um aumento no conteúdo de alfa-hélices (2% para 15%), diminuição da porcentagem de folhas beta (31% para 22%) e uma redução quanto aos elementos

sem conformação definida (51% para 46%), enquanto os giros permaneceram praticamente inalterados (16% para 17%), para a rCollineina-1 e PEG-rCollineina-1, respectivamente.

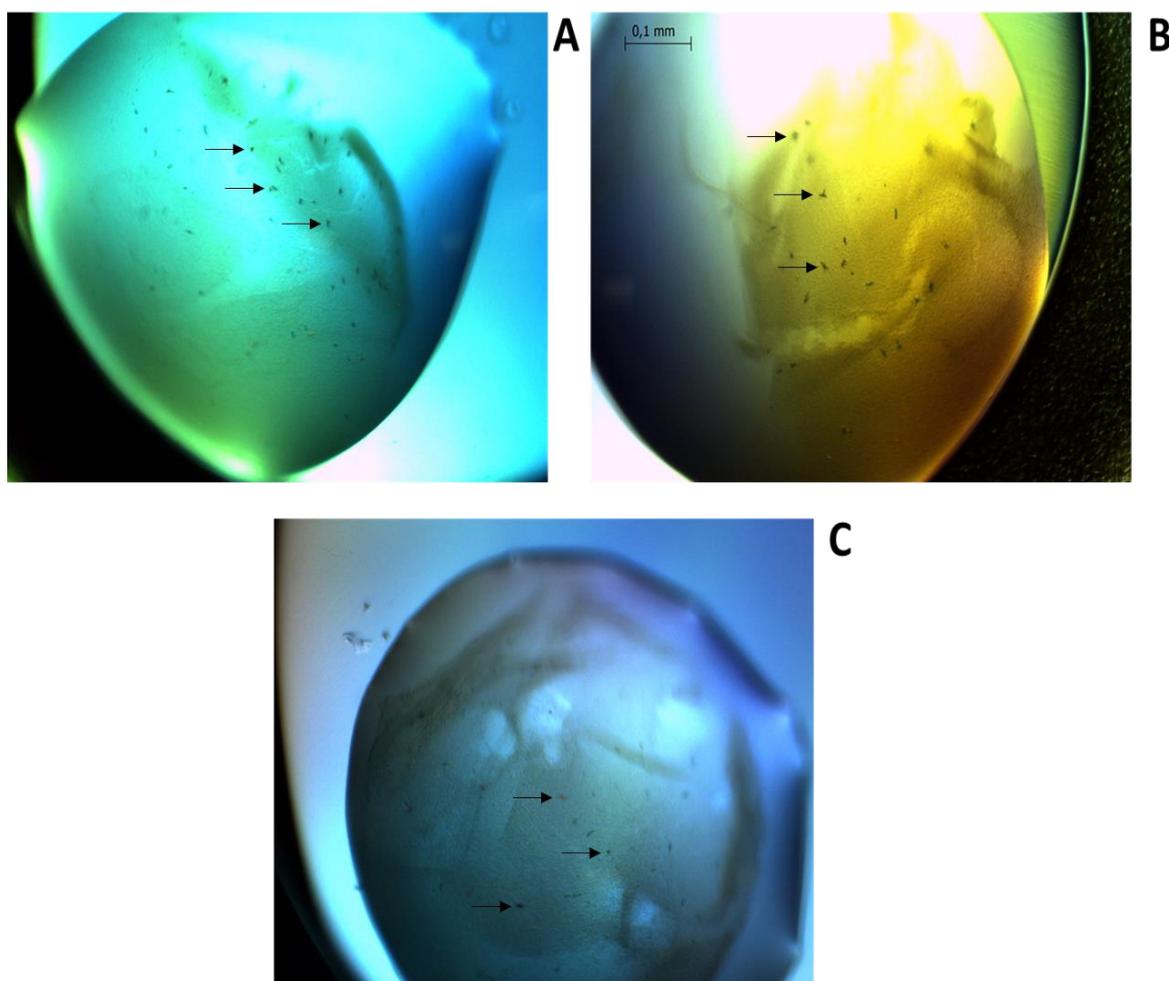
Acredita-se que a rCollineina-1 apresente valores ligeiramente diferentes daqueles encontrados pelas outras formas da enzima por conta das metodologias de purificação empregadas neste estudo, extensivamente discutido no item 4.5.1. Esta forma da enzima, recombinante não-PEGlada, é a única que não é purificada empregando-se a cromatografia em fase reversa, a qual utiliza solventes orgânicos como fase móvel para eluição dos componentes. Como apresentado anteriormente, a presença deste solvente pode causar alterações estruturais e funcionais em proteínas, em decorrência da mudança de polaridade da solução (ARUNKUMAR et al., 1997; GEKKO et al., 1998; SERRANO et al., 2000).

Em outros trabalhos que relatam a PEGlação de proteínas, pouca ou nenhuma mudança foi reportada em relação a suas características estruturais. Em trabalho recente, a albumina sérica bovina (BSA) foi PEGlada utilizando diferentes derivados de PEG e avaliada quanto às suas diferentes características estruturais (FEREBEE et al., 2016). Os resultados de dicroísmo circular mostraram que não houve mudanças estruturais para nenhuma forma PEGlada desta proteína. Resultados semelhantes foram encontrados para o fator estimulante de colônias de granulócitos humanos recombinante PEGlado (rhG-CSF) (KINSTLER et al., 1996), lisozima (FREITAS DDA e ABRAHAO-NETO, 2010), uricase (FREITAS DDA et al., 2010), endostatina (GUO et al., 2019) e  $\beta$ -lactoglobulina (LUO et al., 2019).

Com base nestes dados, observa-se que a PEGlação não causou mudanças estruturais significativas nas proteínas nativa e recombinante, uma vez que o conteúdo de estruturas secundárias foi semelhante para todas as formas da enzima. Este resultado corrobora com os estudos funcionais deste trabalho, que mostram a manutenção da atividade catalítica das enzimas PEGladas sobre diferentes substratos, discutidos nos itens 4.6.1 e 4.6.2.

#### **4.5.5. Cristalização da collineina-1 nativa**

Para o ensaio de cristalização da collineina-1, foi utilizada uma solução da enzima, em água ultrapura, na concentração de 10 mg/mL. Das 96 condições testadas inicialmente, três delas apresentaram pontos de nucleação, sendo: **1)** Tiocianato de potássio 100 mM + 30% (m/v) de PEG MME 2000; **2)** Tampão Tris 100 mM, pH 8.5 + sulfato de lítio 200 mM + 40% (m/v) de PEG 4000 e **3)** 10% (m/v) de PEG 1000 + 10% (m/v) de PEG 8000 (Fig. 51).



**Figura 51. Pontos de nucleação da collineina-1 nativa.** A concentração de enzima utilizada nos ensaios de cristalização foi de 10 mg/mL em água ultrapura. Volume da gota: 0,5  $\mu$ L (0,25  $\mu$ L de solução de proteína + 0,25  $\mu$ L da solução de cristalização). Condições de cristalização: **(A)** 10% (m/v) de PEG 1000 + 10% (m/v) de PEG 8000, **(B)** Tiocianato de potássio 100 mM + 30% (m/v) de PEG MME 2000, **(C)** Tampão Tris 100 mM, pH 8.5 + sulfato de lítio 200 mM + 40% (m/v) de PEG 4000. Ensaios realizados a 18 °C. Imagens obtidas no 20º dia.

Entretanto, os pontos de nucleação formados apresentaram tamanho reduzido, inviabilizando sua captura para o processo de difração de raios-X. A fim de otimizar a formação destes pontos, estas três condições foram otimizadas, ampliando as concentrações dos agentes precipitantes, conforme indicado na figura 21. Estas novas condições estão mantidas em temperatura de 18 °C. Até o momento, não foram observados novos pontos de nucleação.

Apenas um pequeno número de estruturas de SVSPs foram depositadas no PDB, o que reforça a necessidade da obtenção de novas estruturas desta classe de proteínas, a fim de melhor entender a sua relação estrutura-função. Ademais, a caracterização estrutural da collineina-1 é fundamental para a aplicação desta proteína como potencial biofármaco. Assim, outras

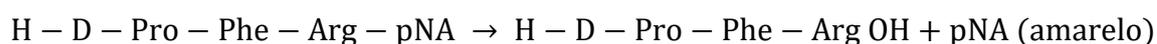
tentativas de cristalização desta SVSP estão em andamento, a fim de validar a estrutura obtida nos experimentos de modelagem molecular.

## 4.6. Caracterização funcional e bioquímica

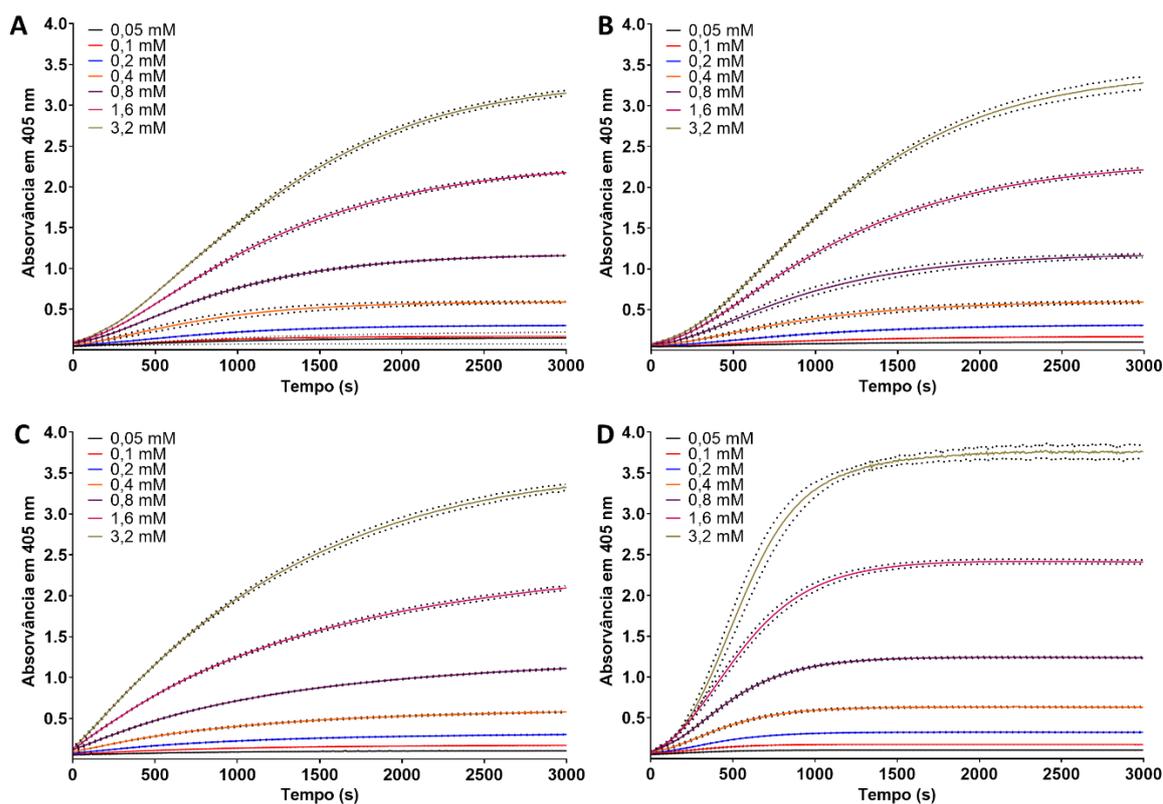
### 4.6.1. Cinética enzimática

Para a determinação dos parâmetros de cinética enzimática ( $V_{\max}$ ,  $k_{\text{cat}}$ ,  $K_m$  e  $k_{\text{cat}}/K_m$ ), foi avaliada a atividade hidrolítica das enzimas nativa, recombinante e suas formas PEGladas sobre o substrato cromogênico S-2302 (Chromogenix<sup>®</sup>), para a calicreína plasmática e fator XIIIa. Este substrato foi escolhido de acordo com um estudo previamente feito por Boldrini-França e colaboradores (2015), no qual foi observado que as formas nativa e recombinante desta serinoprotease possuem maior atividade catalítica para este substrato, quando comparada com outros substratos cromogênicos [S-2251 (plasmina e plasminogênio ativado por estreptoquinase), S-2238 (trombina) e S-2222 (fator Xa)].

O mecanismo dessa reação de hidrólise se dá pela quebra do substrato em uma região específica, conforme indicado abaixo, liberando um cromóforo (pNA, paranitroanilina) que apresenta absorvância no comprimento de onda de 405 nm. Assim, quanto maior a absorvância, maior a hidrólise do substrato pela enzima, durante o tempo de incubação. A reação de hidrólise do substrato S2302 é representada abaixo:

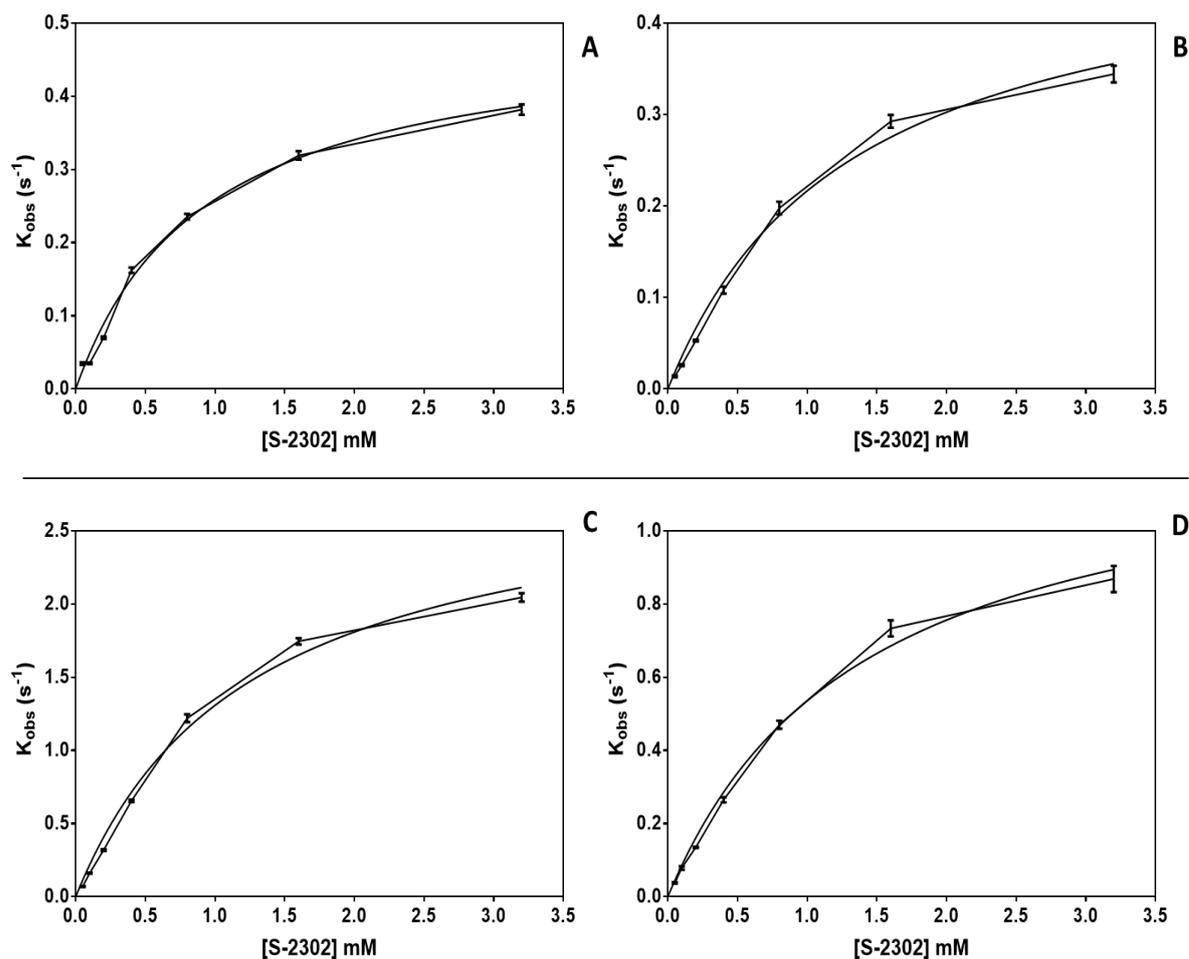


Os experimentos foram realizados com diferentes concentrações do substrato (0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,8 mM, 1,6 mM e 3,2 mM). Para as diferentes formas da enzima, foram utilizadas duas concentrações diferentes:  $2,5 \times 10^{-4}$  mM para a collineína-1 nativa e para as formas nativa e recombinante PEGladas e de  $6,25 \times 10^{-5}$  mM para a forma recombinante. A atividade enzimática de todas as formas da collineína-1 testadas seguiram o modelo cinético de Michaelis-Menten, exibindo uma curva hiperbólica de velocidade por concentração de substrato (Fig. 52).



**Figura 52.** Curva cinética de formação de produto *versus* tempo de reação das diferentes formas da enzima. (A) collineina-1; (B) PEG-collineina-1; (C) rCollineina-1 e (D) PEG-rCollineina-1. Experimento realizado em triplicata, a 37 °C.

Após as reações, foi escolhido um intervalo de tempo (0-300 segundos), no qual o gráfico da taxa de formação de produto apresenta caráter linear, ou seja, intervalo no qual a concentração do substrato não altera a velocidade da enzima (LEHNINGER et al., 2013). Esta faixa linear é utilizada, então, para a determinação da inclinação da reta de cada concentração de substrato (*slope*), necessária para os cálculos da constante  $K_{obs}$ , empregada na determinação dos parâmetros cinéticos (Fig. 53), apresentando unidade  $s^{-1}$ , em função da concentração de substrato, em mM. Deste modo, estão expressos os diferentes valores de  $k_{cat}$  para cada concentração de substrato utilizada. Os valores de *turnover* ( $k_{cat}$ ),  $K_m$  e de eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) foram determinados pela derivação da curva elíptica de Michaelis-Menten (Tab. 10).



**Figura 53. Curva cinética de Michaelis-Menten das diferentes formas da enzima. (A)** collineina-1; **(B)** PEG-collineina-1; **(C)** rCollineina-1 e **(D)** PEG-rCollineina-1. Os ensaios foram realizados em triplicata, através da incubação das enzimas com diferentes concentrações do substrato S-2302, à 37 °C.

A collineina-1 recombinante apresentou valores de *turnover* ( $2,934 \pm 0,084 \text{ s}^{-1}$ ) e de eficiência catalítica ( $2,4 \pm 0,115 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) superiores a todas as outras formas da enzima (Tab. 10). Supõe-se que esta diferença seja devida ao fato de que as outras formas da enzima (collineina-1, PEG-collineina-1 e PEG-rCollineina-1) são purificadas utilizando cromatografia em fase reversa, com o uso de solvente orgânico (acetonitrila) e de TFA, que podem induzir certo grau de desnaturação da proteína (OROSZLAN et al., 1992). Por outro lado, a rCollineina-1 é purificada através de cromatografia de afinidade e de troca iônica, sem o uso destes componentes. Assim, o uso destes elementos pode estar influenciando na atividade das enzimas submetidas a este processo de purificação, explicando a diferença observada nos parâmetros cinéticos. A exposição de sítios hidrofóbicos das diferentes formas da enzima pode influenciar no reconhecimento e acoplamento de substratos ao sítio ativo da enzima. Estes parâmetros

foram extensivamente discutidos no item 4.5.1. Entretanto, todas as formas testadas mantiveram suas atividades catalíticas na mesma ordem de grandeza.

**Tabela 10. Parâmetros cinéticos das diferentes formas da collineina-1, para o substrato cromogênico S-2302**

Formas da enzima	Parâmetros cinéticos		
	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )*	$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )*
Collineina-1	0,920 ± 0,079	0,497 ± 0,017	0,5 ± 0,048
PEG-collineina-1	1,317 ± 0,117	0,502 ± 0,020	0,4 ± 0,068
rCollineina-1	1,243 ± 0,113	2,934 ± 0,084	2,4 ± 0,115
PEG-rCollineina-1	1,400 ± 0,119	1,286 ± 0,050	0,9 ± 0,084

\* $k_{cat}$ :  $V_{max}/[E]$ , sendo  $[E]$  a concentração em mM da enzima no volume final do ensaio.  $K_{cat}$ , ou número de *turnover*, corresponde ao número de ciclos catalíticos que o sítio ativo da enzima apresenta por unidade de tempo, e em que a enzima está funcionando com a máxima eficiência. \*\* $k_{cat}/K_m$ : corresponde à eficiência catalítica, ou seja, à quantidade de substrato convertida em produto, por sítio catalítico, por unidade de tempo.

Similarmente aos valores encontrados neste trabalho, uma serinoprotease de *Bothrops moojeni*, denominada MSP1, apresentou  $K_m$  de 1,912 mM,  $k_{cat}$  igual a 0,32 s<sup>-1</sup> e  $k_{cat}/K_m$  de 0,167 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> sobre o substrato cromogênico S-2302 (SERRANO et al., 1993). Por outro lado, uma SVSP de *Trimeresurus jerdonii* apresentou valores de  $K_M$  igual 27 μM,  $k_{cat}$  de 10,2 s<sup>-1</sup> e  $k_{cat}/K_m$  de 22,68 μM.min<sup>-1</sup> (JIN et al., 2001), sendo cataliticamente mais ativa que todas as formas da collineina-1. Da mesma forma, a TSV-PA, uma SVSP de *Trimeresurus stejnegeri* apresentou resultados semelhantes, com  $K_m = 91$  μM,  $k_{cat}$  de 2,83 s<sup>-1</sup> e  $k_{cat}/K_m$  igual a 1,9 μM.min<sup>-1</sup> (ZHANG et al., 1995).

Estudos anteriores realizados com a collineina-1 nativa, PEGlada e não PEGlada, utilizando o substrato TAME (Nα-p-Tosyl-L-arginine methyl ester), mostraram valores de *turnover* de 4,49 s<sup>-1</sup> e 8,68 s<sup>-1</sup> e de eficiência catalítica de 5,83 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> e 19,38 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> para a enzima não-PEGlada e PEGlada, respectivamente (DA-SILVA-FREITAS et al., 2015). Comparativamente, a enzima giroxina (uma SVSP de *C. d. terrificus*) apresentou valores de *turnover* ( $k_{cat}$ ) menores do que os obtidos pelas quatro formas da collineina-1 (0,083 s<sup>-1</sup>), quando utilizado o substrato sintético ZFR-MCA. Por outro lado, a eficiência catalítica desta enzima foi de 1,55 mM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> (YONAMINE et al., 2012), superior aos valores encontrados com a enzima nativa e as formas nativa e recombinante PEGladas, embora seja inferior à eficiência catalítica da collineina-1 recombinante.

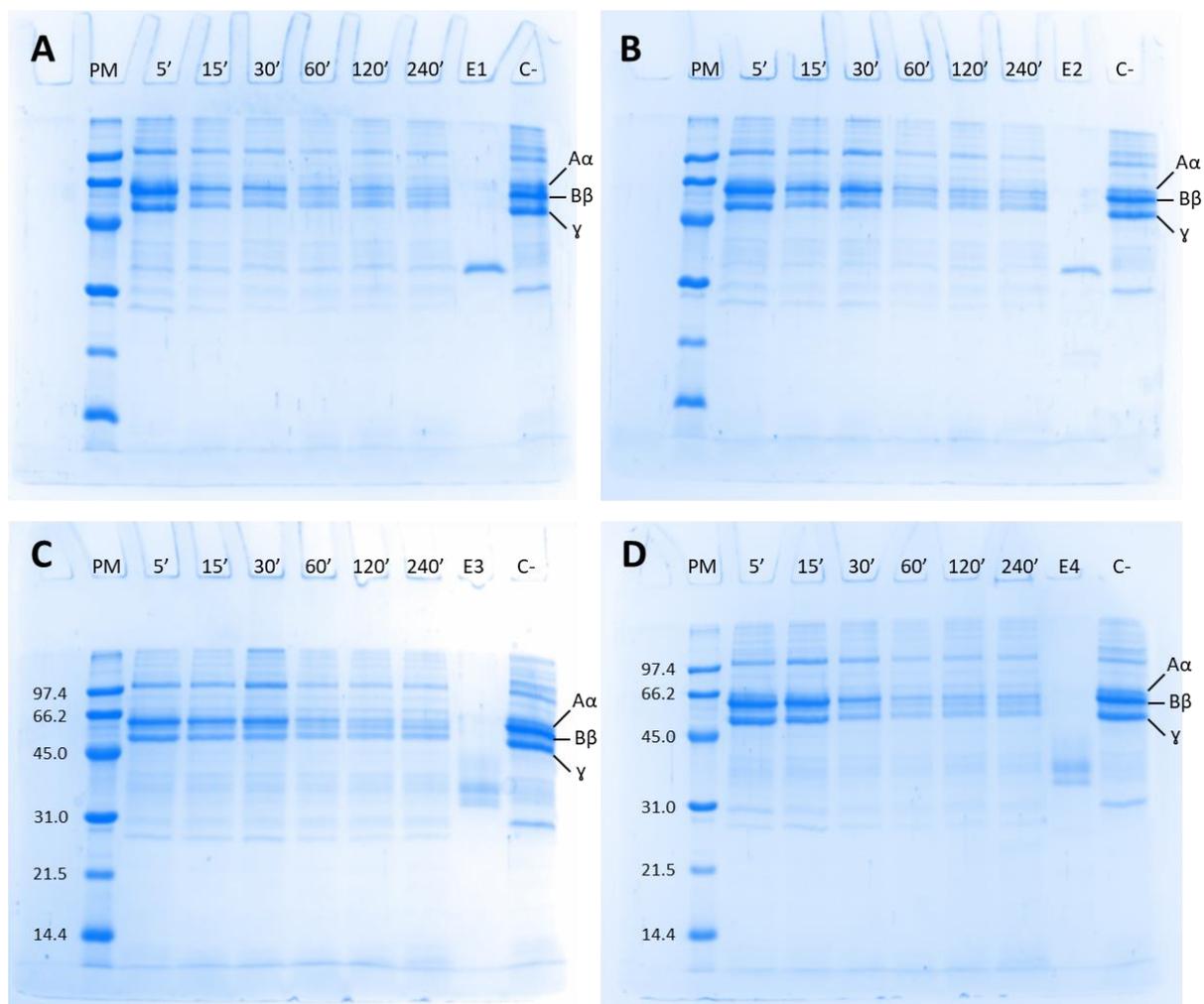
Com posse destes resultados, observa-se que as enzimas PEGladas mantiveram sua atividade catalítica sobre o substrato utilizado na caracterização cinética. Os parâmetros cinéticos indicam que a PEGlação não teve interferência significativa nesta atividade, uma vez que as enzimas PEGladas apresentam valores similares aos das proteínas não-PEGladas, na mesma ordem de grandeza.

#### 4.6.2. Avaliação da atividade fibrinogenolítica

As SVSPs trombina-símile, presentes em peçonhas de serpentes, apresentam atividade semelhante à trombina por clivarem as cadeias  $A\alpha$  e/ou  $B\beta$  do fibrinogênio. Entretanto, a maioria destas enzimas apresenta especificidade por uma dessas cadeias, liberando, preferencialmente, um dos fibrinopeptídeos. Embora existam exceções, grande parte das SVSPs caracterizadas até o momento também não apresenta a capacidade de ativação do fator XIII das vias da coagulação. Deste modo, não ocorre a formação das ligações cruzadas no coágulo de fibrina, fazendo com que este seja mais suscetível à degradação proteolítica pelo sistema fibrinolítico (PRADNIWAT e ROJNUCKARIN, 2014).

Todas as formas da collineina-1 apresentaram preferência em degradar a cadeia  $A\alpha$  do fibrinogênio, embora uma pequena degradação da cadeia  $B\beta$  também tenha sido observada. Este resultado é evidenciado pela comparação das massas moleculares das cadeias  $A\alpha$ ,  $B\beta$  e  $\gamma$ , nos diferentes tempos de incubação, com aquelas presentes no controle negativo (Fig. 54).

Ademais, também foram observadas bandas na região de 30 a 45 kDa, compatíveis com os produtos de degradação do fibrinogênio por SVSPs, encontrados em trabalhos anteriores (SELISTRE e GIGLIO, 1987; VILCA-QUISPE et al., 2010; VALERIANO-ZAPANA et al., 2012; BOLDRINI-FRANCA et al., 2015). As enzimas não apresentaram, entretanto, atividade sobre a cadeia  $\gamma$ , mesmo após 240 minutos de incubação. Embora as cadeias  $A\alpha$  e  $B\beta$  tenham sofrido degradação pelas quatro formas da enzima, nota-se uma preferência pela cadeia  $A\alpha$ , uma vez que esta é praticamente degradada por completo já nos cinco primeiros minutos de reação.



**Figura 54. Atividade fibrinolítica da collineina-1 nativa (A), nativa PEGlada (B), recombinante (C) e recombinante PEGlada (D).** Cada forma da enzima (2  $\mu$ g) foi incubada com 50  $\mu$ L de uma solução de fibrinogênio bovino (1 mg/mL) a 37 °C, durante diferentes intervalos de tempo. Para o controle negativo, foi utilizada apenas a solução de fibrinogênio, sob as mesmas condições. Após a incubação, as amostras foram aplicadas em SDS-PAGE a 13,5%. E1: collineina-1, E2: PEG-collineina-1, E3: rCollineina-1, E4: PEG-rCollineina-1, PM: marcador de massas moleculares; C-: controle negativo.

Deste modo, nota-se que a PEGlação não alterou a capacidade fibrinolítica da collineina-1, tanto para a forma nativa quanto para a recombinante. A degradação deste substrato endógeno, presente no sangue humano, é essencial para a potencial atividade terapêutica desta enzima para o tratamento de distúrbios da coagulação, uma vez que SVSPs podem ser empregadas como agentes defibrinogénicos em casos de trombose, AVC e outras doenças relacionadas à formação descontrolada de trombos. A manutenção desta atividade após a PEGlação é um passo importante para o desenvolvimento deste projeto, uma vez que a modificação estrutural proposta não alterou a atividade desejada da proteína.

Atualmente, a busca por novas estratégias terapêuticas para tratar disfunções fisiológicas relacionadas ao sistema hemostático é objetivo de vários estudos. Entretanto, poucos deles envolvem a PEGlação de toxinas provenientes de peçonhas de serpentes (DASILVA-FREITAS et al., 2015). Esta técnica de modificação de proteínas tem se mostrado promissora na aplicação de peptídeos e proteínas no contexto clínico (BOCCU et al., 1982; ROBERTS et al., 2002; SHARMA et al., 2017). Deste modo, a PEGlação de uma proteína recombinante, com ação neste sistema, é um passo importante e inovador na busca de novos biofármacos capazes de atuarem em tais disfunções.

### 4.6.3. Atividade em canais iônicos

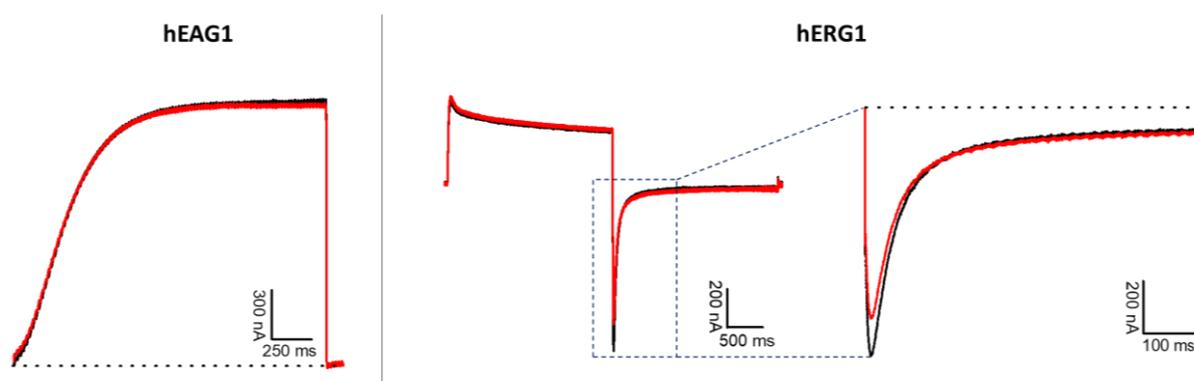
#### 4.6.3.1. Comparação da atividade das formas PEGladas e não PEGladas da collineina-1 nos canais iônicos hEAG1 e hERG1

De acordo com estudos anteriores de eletrofisiologia, envolvendo a collineina-1 nativa e recombinante, observou-se que elas atuam, majoritariamente, no canal para potássio hEAG1, possuindo um  $IC_{50}$  na faixa de 2-4  $\mu$ M (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2020). Ademais, também foi observada uma pequena atividade no canal hERG, da mesma família do hEAG1. Como apresentado, estes canais são superexpressos em várias linhagens cancerígenas. Desta maneira, a descoberta e aprimoramento de terapias baseadas na inibição destas estruturas é um dos focos da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de tumores.

Consequentemente, com o desenvolvimento e obtenção das formas PEGladas da collineina-1 (PEG-collineina-1 e PEG-rCollineina-1), este trabalho também buscou avaliar se as formas modificadas destas enzimas mantinham sua atividade sobre este canal iônico. Além disso, um novo *screening* foi realizado, em canais para potássio, sódio e cálcio, a fim de avaliar se a collineina-1 apresenta outro canal iônico como alvo.

Em um primeiro momento, foi avaliado se o derivado de PEG utilizado no processo de PEGlação (mPEG-maleimide, 5 kDa) apresentava alguma atividade nos canais iônicos de interesse (hEAG1 e hERG1). Surpreendentemente, a uma concentração de 10  $\mu$ M, esta molécula apresentou uma inibição de  $9,24 \pm 1,7\%$  no hERG1 (Fig. 55). Resultados semelhantes foram encontrados por Himmel (2007), avaliando a inibição do canal hERG na presença de PEG400 em diferentes concentrações. Foi observado que, a uma concentração de 5% (v/v), este derivado de PEG causou inibição da corrente de cauda deste canal em aproximadamente 50%.

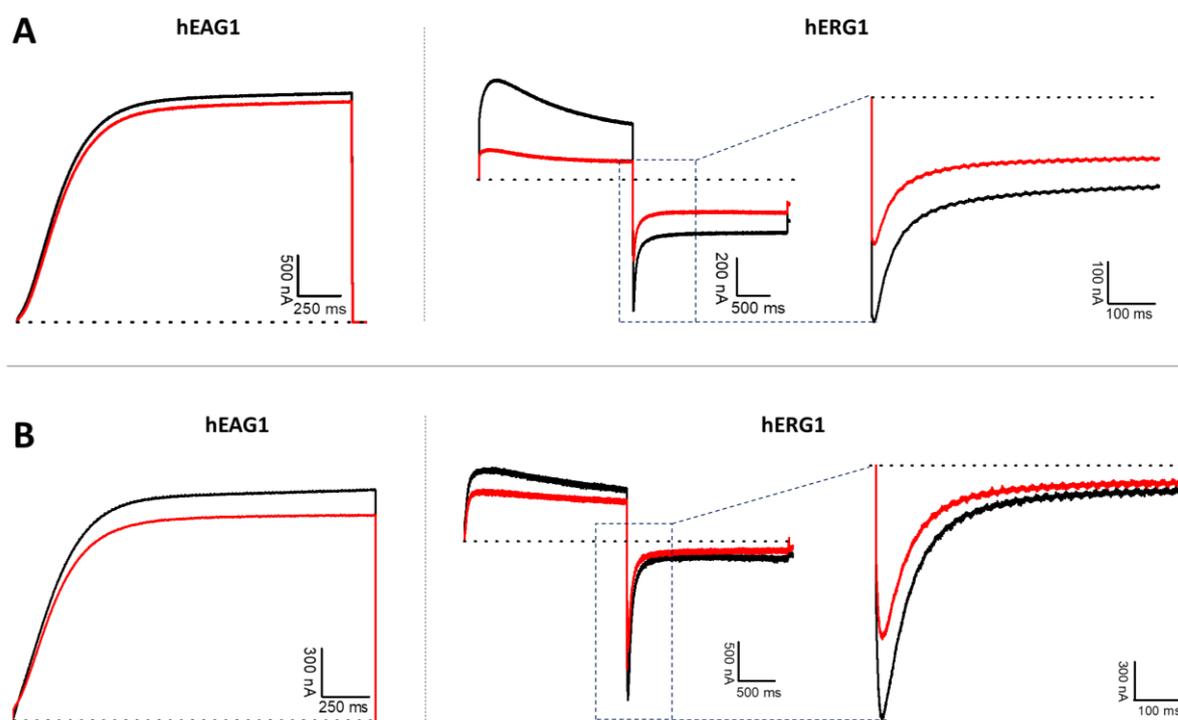
Outros estudos também relacionam a inibição de canais iônicos com moléculas conjugadas a polietilenoglicóis, como demonstrado por Lin e Licht (2014), que desenvolveram bloqueadores de receptores de acetilcolina (AChR) baseados em PEG. Diferentes trabalhos demonstram que moléculas conjugadas a derivados de PEG também apresentam capacidade de inibição de canais para cálcio (OCHI et al., 2014) e porinas (OmpF) (ROSTOVTSEVA et al., 2002). Paralelamente, outros estudos relacionam a interação de polietilenoglicóis com canais iônicos e proteínas formadoras de poros em membranas (BEZRUKOV et al., 1996; BEZRUKOV e KASIANOWICZ, 1997; MOVILEANU et al., 2000).



**Figura 55. Efeito da adição de 10  $\mu$ M de mPEG-maleimide (5 kDa) nas correntes dos canais iônicos hEAG1 e hERG1.** Os traços pretos representam a condição controle, enquanto os traços vermelhos indicam a corrente obtida após a adição do PEG. A região destacada na corrente do hERG1 evidencia a diferença na corrente de cauda deste canal após a adição do composto. Os gráficos ilustram os efeitos obtidos em uma série de três experimentos independentes (n=3).

Posteriormente, a atividade das formas PEGladas da collineína-1 nativa (PEG-collineína-1) e recombinante (PEG-rCollineína-1), nos canais hEAG1 e hERG1, foi avaliada (Fig. 56, painéis A e B, respectivamente). Os experimentos foram realizados a uma concentração de 5  $\mu$ M, próxima ao  $IC_{50}$  observado pelas proteínas não-PEGladas no hEAG1 (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2020).

As proteínas PEGladas apresentaram grande perda de afinidade pelo hEAG1, uma vez que a PEG-collineína-1 apresentou inibição de apenas 8,2% e a PEG-rCollineína-1 inibiu 5,7% da atividade deste canal. Correlacionando os dados de inibição das quatro formas da enzima (Fig. 57), observa-se uma perda da capacidade de inibição de aproximadamente cinco vezes para a forma nativa PEGlada (45,5  $\pm$  13,4% para 8,2  $\pm$  4,7% ) e oito vezes para a forma recombinante PEGlada (50,3  $\pm$  6,0% para 5,7  $\pm$  3,7%).

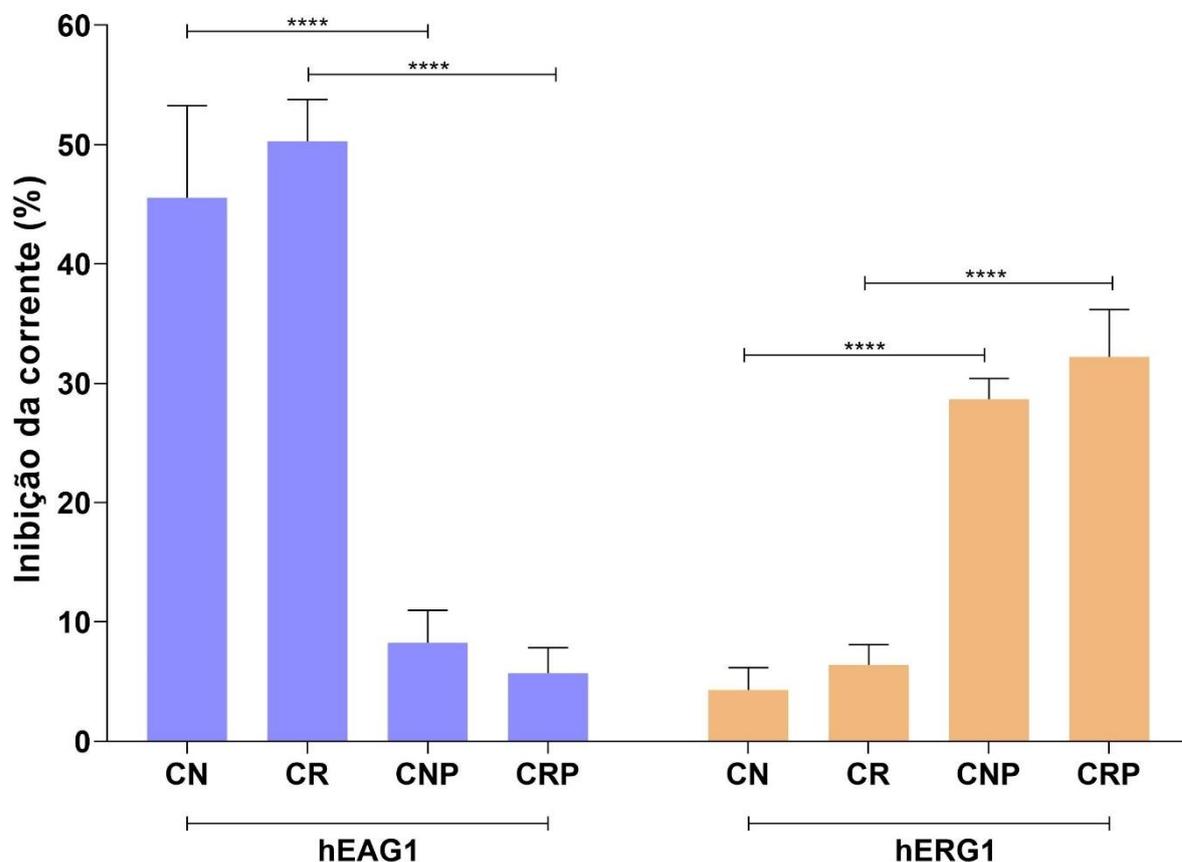


**Figura 56. Atividade da (A) PEG-collineína-1 e (B) PEG-rCollineína-1 nos canais iônicos hEAG1 e hERG1.** Os traços pretos representam a condição controle, enquanto os traços vermelhos indicam a corrente obtida após a adição das proteínas PEGladas. As regiões destacadas nas correntes do hERG1 evidenciam a diferença na corrente de cauda deste canal após a adição das proteínas. Os gráficos ilustram os efeitos obtidos em uma série de três experimentos independentes (n=3).

De forma semelhante, outros dados na literatura demonstram a perda de afinidade de proteínas PEGladas a seus alvos moleculares, em comparação com suas estruturas sem esta modificação. A PEGlação do inibidor de Kv1.3 HsTX1 diminuiu em cerca de 1300 vezes a capacidade de inibição deste composto, embora não tenha modificado a afinidade pelo seu alvo (TANNER et al., 2017). A PEGlação de fragmentos Fab do anticorpo Trastuzumab também reduziu sua afinidade entre cinco e oito vezes, dependendo do PEG utilizado (SELIS et al., 2016).

Embora a perda de afinidade após a PEGlação não tenha sido mecanisticamente explicada, alguns autores sugerem que fatores como tamanho da proteína, densidade superficial, tamanho e ramificação das cadeias do PEG, além da estratégia de PEGlação utilizada, interferem diretamente na afinidade destas proteínas aos seus alvos (CHAPMAN, 2002). Todos esses fatores apresentam efeito acumulativo, e quanto mais próxima esta

modificação se encontra do farmacóforo destas proteínas, mais severo será o efeito sobre a sua afinidade (MEJÍA-MANZANO et al., 2020).

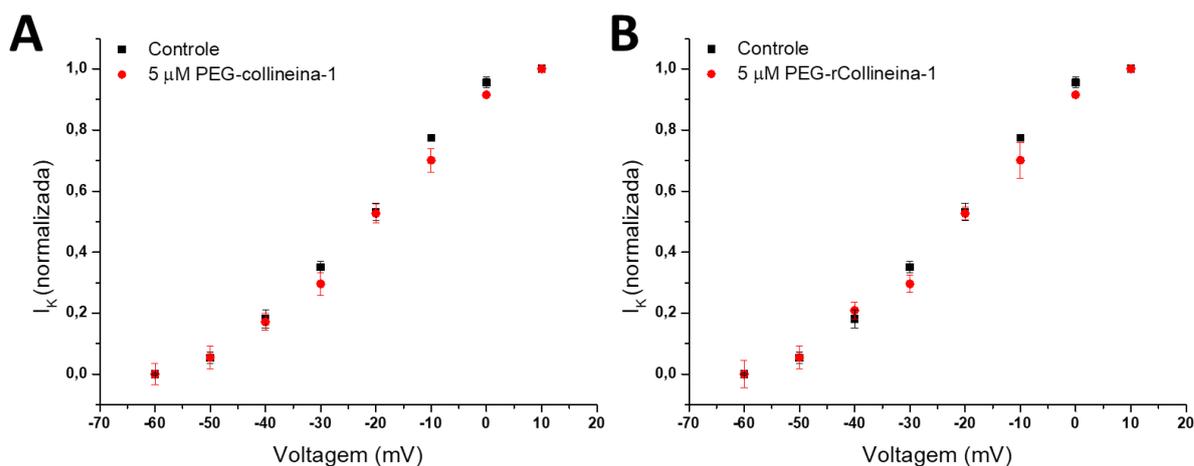


**Figura 57. Análise comparativa da inibição das diferentes formas da colina-1, a 5  $\mu$ M, nos canais para potássio hEAG1 e hERG1.** CN: colina-1 nativa; CR: rColina-1; CNP: PEG-colina-1 e CRP: PEG-rColina-1. (n=3)  $\pm$  SEM; SEM: erro padrão da média. \*\*\*\*p<0,0001.

Apesar das formas PEGladas da colina-1 terem perdido significativamente sua afinidade pelo hEAG1, houve um aumento notável da inibição do canal hERG1 por ambas as proteínas (Fig. 56 e Fig. 57). A PEGlção aumentou a inibição do hERG1 em aproximadamente seis vezes para proteína nativa ( $4,3 \pm 3,2\%$  para  $28,7 \pm 3\%$ ) e cinco vezes para a proteína recombinante ( $6,4 \pm 2,9\%$  para  $32,2 \pm 6,8\%$ ), quando testas a uma concentração de 5  $\mu$ M.

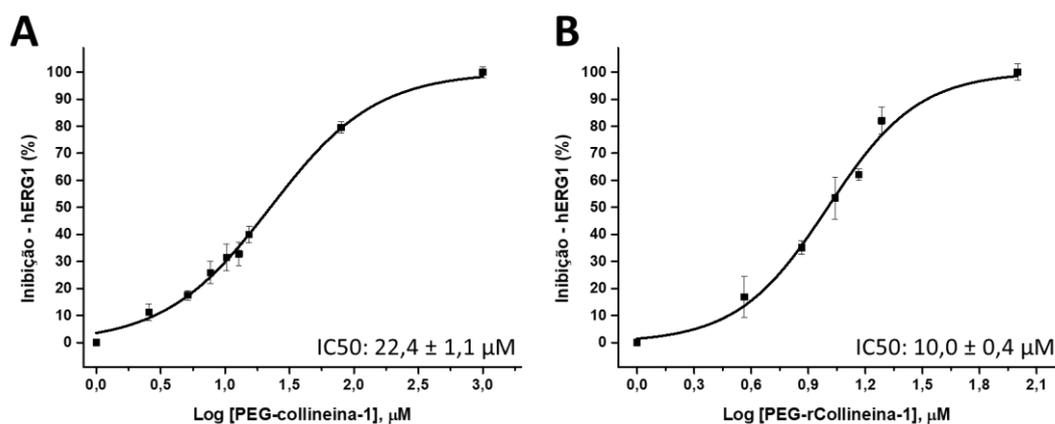
Embora não exista, até o momento, um fundamento mecanístico para esta mudança de afinidade das proteínas PEGladas para o canal iônico hERG1, acredita-se que a fraca, porém existente, afinidade da colina-1 para este canal (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2020) favoreça sua inibição pelo mPEG-maleimide, promovendo a interação deste composto com o poro do canal, bloqueando-o. A fim de sustentar esta hipótese, estudos da dependência de

voltagem para o funcionamento deste canal foram realizados na presença das proteínas PEGladas (Fig. 58). Observa-se que não há mudança significativa dos valores de  $V_{half}$  (-22,9 mV para -18,3 mV para a PEG-collineina-1 e -22,9 mV para -17,9 mV para a PEG-rCollineina-1), demonstrando que a inibição ocorre devido a um bloqueio do poro, e não pela interação das proteínas PEGladas na região sensível à voltagem do canal iônico.



**Figura 58. Relação voltagem-corrente do canal hERG1 na presença de PEG-collineina-1 (A) e PEG-rCollineina-1 (B).** (n=3)  $\pm$  SEM; SEM: erro padrão da média.

Após avaliar a mudança de atividade das proteínas PEGladas do canal hERG1 para hERG1, buscou-se avaliar a eficiência da inibição deste canal por essas proteínas, através da determinação dos valores de  $IC_{50}$  (Fig. 59). Os valores deste parâmetro foram de  $22,4 \pm 1,1 \mu$ M e de  $10,0 \pm 0,4 \mu$ M para a PEG-collineina-1 e PEG-rCollineina-1, respectivamente. Deste modo, embora as proteínas PEGladas possuam efeito no canal hERG1, sua capacidade inibitória é relativamente baixa, quando comparada a outros compostos. Substâncias análogas da fenotiazina, como thioridazina, perpenazina, trifluoperazina e cloropromazina, possuem  $IC_{50}$  na faixa de nanomolar (KIM e KIM, 2005), valores similares aos da amiodarona, astemizol, imipramina e cetoconazol (CHIU et al., 2004), com capacidade inibitória mil vezes maior do que as formas PEGladas da collineina-1.



**Figura 59. Curvas de dose-resposta da PEG-collineina-1 (A) e PEG-rCollineina-1 (B), no canal iônico hERG1.** Os gráficos indicam a curva obtida plotando os valores da inibição do hERG1 versus a concentração, em escala logarítmica, das enzimas PEGladas. (n=3) ± SEM; SEM: erro padrão da média.

Em estudos conduzidos *in vivo*, avaliando a interferência da rCollineina-1 nos parâmetros de coagulação sanguínea, observou-se que a dose mínima necessária para tornar o sangue incoagulável é de 7,5 mg/kg em camundongos (BOLDRINI-FRANCA et al., 2019). Comparativamente, esta dose seria equivalente a uma concentração de 254 nM, considerando que a enzima se distribua de maneira semelhante em todo o corpo do animal. Esta concentração é mais de mil vezes inferior ao IC<sub>50</sub> obtido pelas proteínas PEGladas no hERG1 *in vitro*. Entretanto, estudos posteriores são necessários a fim de descartar possíveis efeitos adversos destes compostos, devido à inibição deste canal iônico.

Em contraste ao hEAG1, o hERG1 é expresso em diferentes partes do organismo, como o miocárdio, sistema nervoso central, trato gastrointestinal e sistema endócrino (ASHER et al., 2010). A importância deste canal iônico na atividade cardíaca tornou-se evidente após a descoberta de que mutações herdadas nesta estrutura estão relacionadas com a síndrome de QT longo. Esta síndrome leva a distúrbios na fase de repolarização cardíaca, predispondo os indivíduos afetados à arritmia, caracterizada por batimentos cardíacos irregulares que podem levar à morte (SANGUINETTI e TRISTANI-FIROUZI, 2006).

Por outro lado, a superexpressão de hERG1, assim como o hEAG1, também é relacionada com o desenvolvimento e progressão de vários tipos de tumores, como neuroblastoma, adenocarcinoma, rabdomiosarcoma, microcitoma pulmonar e leucemias, tendo um papel importante na regulação de mecanismos de proliferação celular, secreção de fatores pró-angiogênicos, invasividade e metástase (ASHER et al., 2010; ASHER et al., 2011; HE et

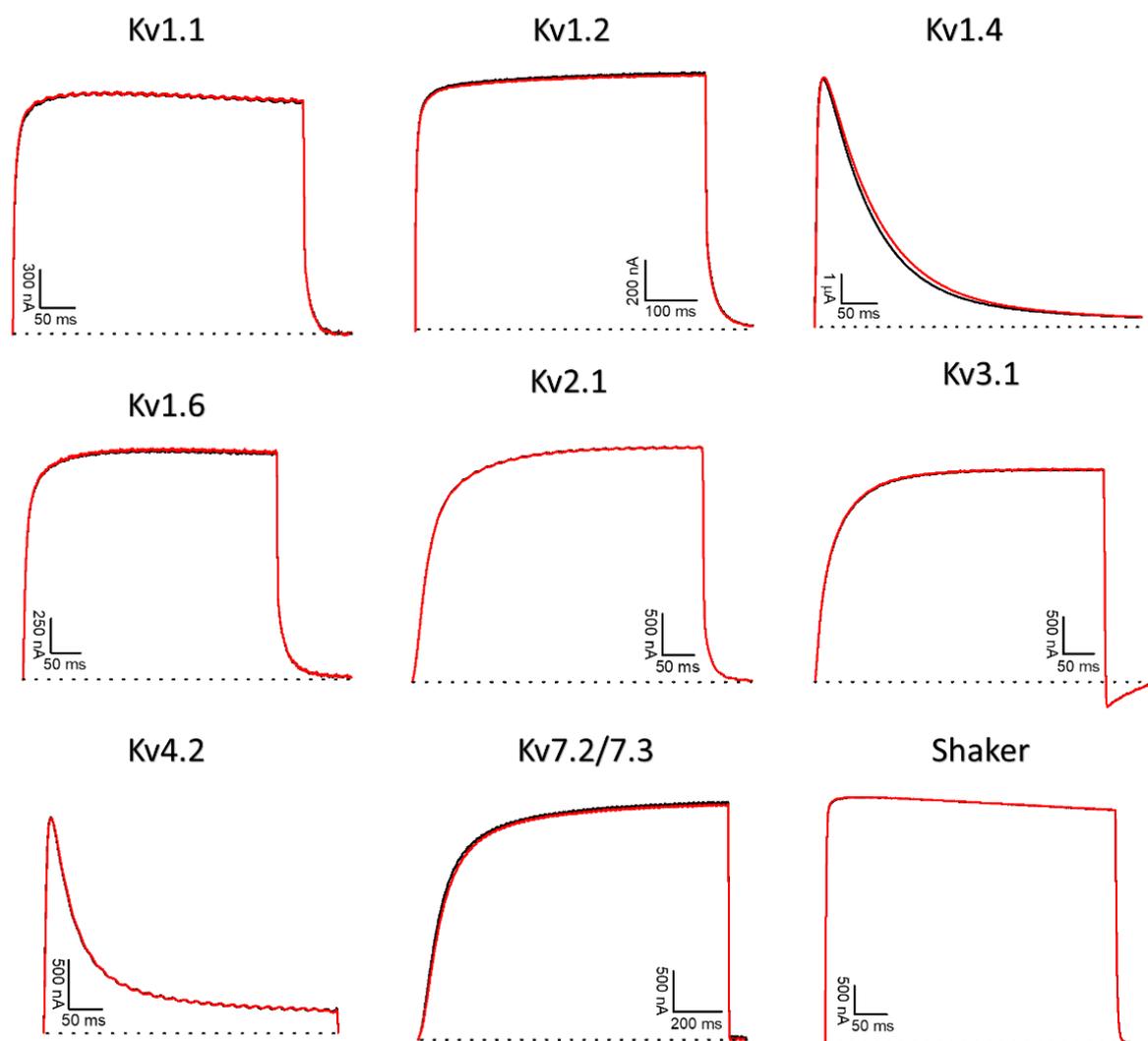
al., 2020). É particularmente importante mencionar que a inibição destes canais demonstrou possuir efeito antineoplásico (GLASSMEIER et al., 2012; JI et al., 2015; ASSIRI et al., 2019), o que reforça a possibilidade deste canal iônico ser utilizado como alvo terapêutico, caso inibidores de hERG1 sejam desenvolvidos com a ausência de efeitos adversos cardíacos (ARCANGELI e BECCHETTI, 2017).

Dadas as mudanças no potencial da membrana durante a progressão do ciclo celular, a possível função de diferentes canais para potássio na regulação do ciclo e proliferação celular tem sido extensivamente investigada. Surpreendentemente, a expressão e a atividade de certos Kvs parecem ser reguladas de maneira diferenciada ao longo do ciclo celular, tanto em células normais quanto em células cancerígenas. Observa-se um aumento na densidade de Kv1.3, hEAG1, Kv10.2 e/ou Kv11.1 (hERG1), nas fases M e G1 de várias linhagens celulares, contribuindo com uma repolarização transitória nestas etapas, seguido por uma diminuição na atividade destes canais durante as fases S e G2 (ARCANGELI e YUAN, 2011). As mudanças nos padrões de expressão e funcionamento de hERG1 podem ocorrer a níveis genômicos, transcricionais, pós-traducionais e epigenéticos, embora os níveis regulatórios deste canal nestes processos ainda não estejam completamente elucidados (JEHLE et al., 2011).

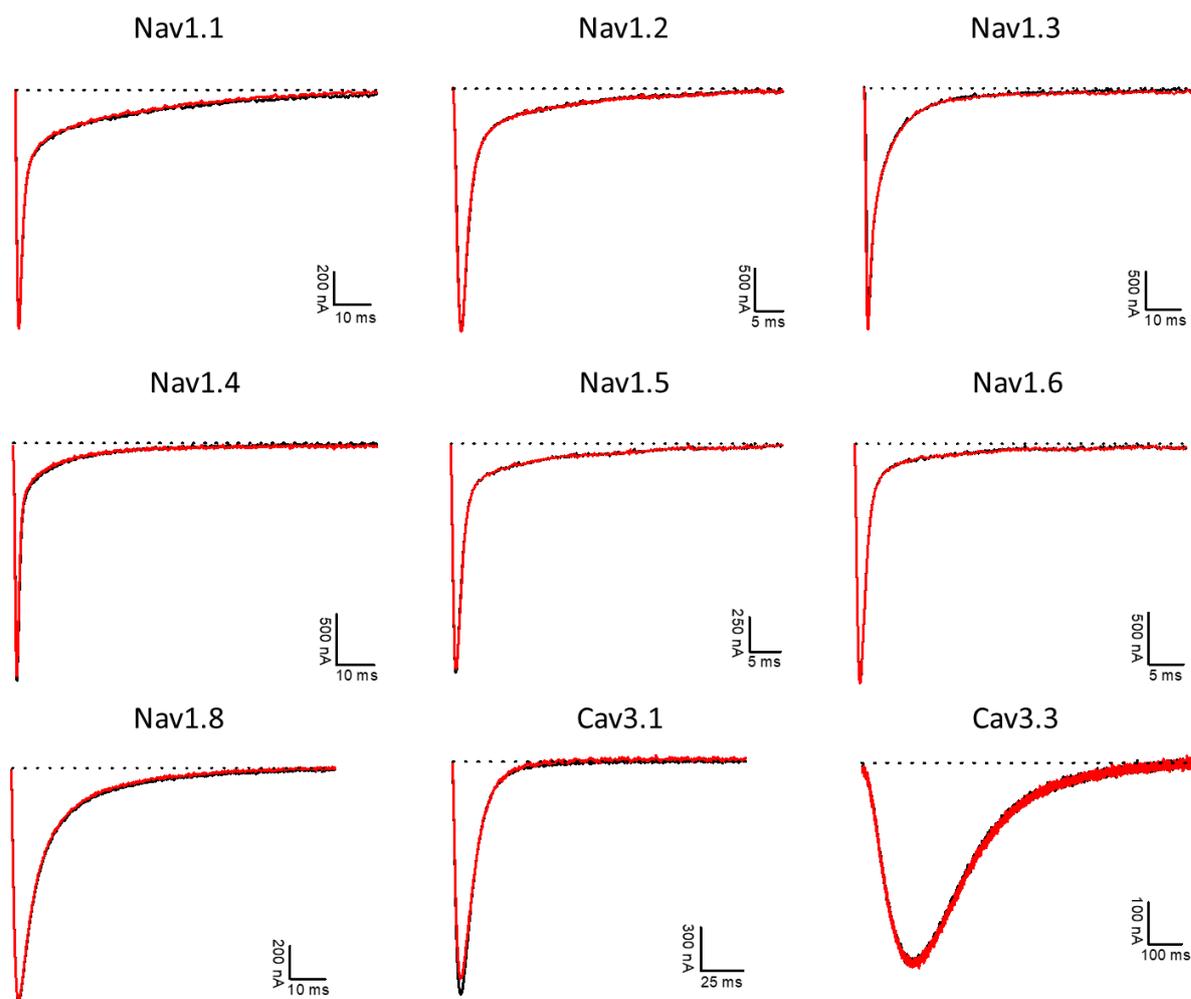
Um estudo mostrou que a transformação maligna de fibroblastos de camundongos poderia ser induzida através da transfecção de hERG1 e que o dofetilida, bloqueador deste canal, poderia reverter esse processo. Após a transfecção, foram observadas alterações morfológicas, de normais para fusiformes, além de a célula com superexpressão de hERG1 mostrar uma perda na inibição do contato celular e aumento na proliferação (JI et al., 2015).

Em outra investigação, Pier e colaboradores observaram que a tumorigênese era dramaticamente reduzida em camundongos BALB/c injetados com a linhagem de células tumoral SGC7901 e tratados com siRNA contra hERG1. Este canal também auxiliou na transição epitelial-mesenquimal nas células cancerígenas colorretais e, através desse processo de transição, as células obtiveram mobilidade e comportamento semelhante às células tronco. O nocaute do hERG1 nesta linhagem reduziu a capacidade tumorigênica dessas células (PIER et al., 2014).

Ademais, a possível atividade da PEG-rCollina-1 em outros canais para potássio (Fig. 60), sódio e cálcio (Fig. 61) dependentes de voltagem também foi avaliada. Observa-se que, a uma concentração de 5  $\mu$ M, essa enzima não apresenta nenhuma atividade relevante nos canais testados, demonstrando que a PEGilação não alterou a seletividade para estes alvos.



**Figura 60.** Avaliação eletrofisiológica da PEG-rCollineina-1 em diferentes canais para potássio dependentes de voltagem. Os traços pretos representam a condição controle, enquanto os traços vermelhos indicam a corrente obtida após a adição da enzima. A atividade nestes canais foi avaliada utilizando a enzima a uma concentração de 5  $\mu\text{M}$ . Os gráficos ilustram os efeitos obtidos em uma série de três experimentos, ( $n=3$ ).



**Figura 61. Avaliação eletrofisiológica da PEG-rCollineina-1 em diferentes canais para sódio e cálcio dependentes de voltagem.** Os traços pretos representam a condição controle, enquanto os traços vermelhos indicam a corrente obtida após a adição da enzima. A atividade nestes canais foi avaliada utilizando a enzima a uma concentração de 5  $\mu$ M. Os gráficos ilustram os efeitos obtidos em uma série de três experimentos, (n=3).

Desta maneira, as formas PEGladas da collineina-1 demonstraram apenas uma fraca atividade inibitória do canal hERG1, com valores de  $IC_{50}$  acima de 10  $\mu$ M. A fim de descartar possíveis efeitos adversos desta particularidade das enzimas PEGladas, estudos *in vivo* avaliando a atividade cardíaca na presença destas proteínas são necessários. Entretanto, estes resultados ampliam as perspectivas para futuros estudos envolvendo a PEGlção da forma mutante da collineina-1 (rCollineina-mut), a qual não apresenta atividade enzimática, como possível agente terapêutico para o tratamento de tumores, através da inibição deste canal iônico.

#### 4.6.3.2. Avaliação da ação da collineina-1 no canal hEAG1 com mutações no domínio sensível à voltagem e porção intracelular

A segunda parte dos estudos de eletrofisiologia buscou avaliar a ação da collineina-1 nativa não-PEGlada no canal hEAG1 com mutações nos aminoácidos pertencentes ao domínio sensível à voltagem, presentes na porção extracelular, e na porção intracelular do hEAG1, além de uma isoforma naturalmente presente, denominada Kv10.1b (hEAG2, Kv10.2). O domínio sensível à voltagem é formado pelos segmentos S1 a S4, enquanto os segmentos S5 e S6 constituem o domínio formador do poro. Foram realizadas seis mutações na região S3b-E2-S4, entre os resíduos 310 e 322, responsáveis por formar o sensor de tensão (*voltage sensor paddle*) do hEAG1 (Fig. 63A, B e C). Os resíduos Ala311, Glu313, Asn314, Val315, Asp316 e Glu317 foram mutados para resíduos de cisteína, técnica de mutagênese empregada para avaliar a importância de determinados resíduos no funcionamento de canais iônicos (SKERRETT et al., 2001). Já na porção intracelular, a mutação foi realizada no resíduo de ácido glutâmico, na posição 600, modificado para um resíduo de arginina (Fig. 63D, E e F).

Outra isoforma codificada pelo gene KCNH1 é o canal Kv10.1b, uma variante da isoforma normal Kv10.1a (hEAG1). As sequências dos dois canais são idênticas, exceto pela adição de um loop extracelular suplementar de 27 resíduos entre os domínios S3 e S4 no Kv10.1b (Fig. 62). A ação da collineina-1 nesta variante do hEAG1 também foi analisada, de forma a avaliar a interferência deste loop adicional na atividade da proteína.

```

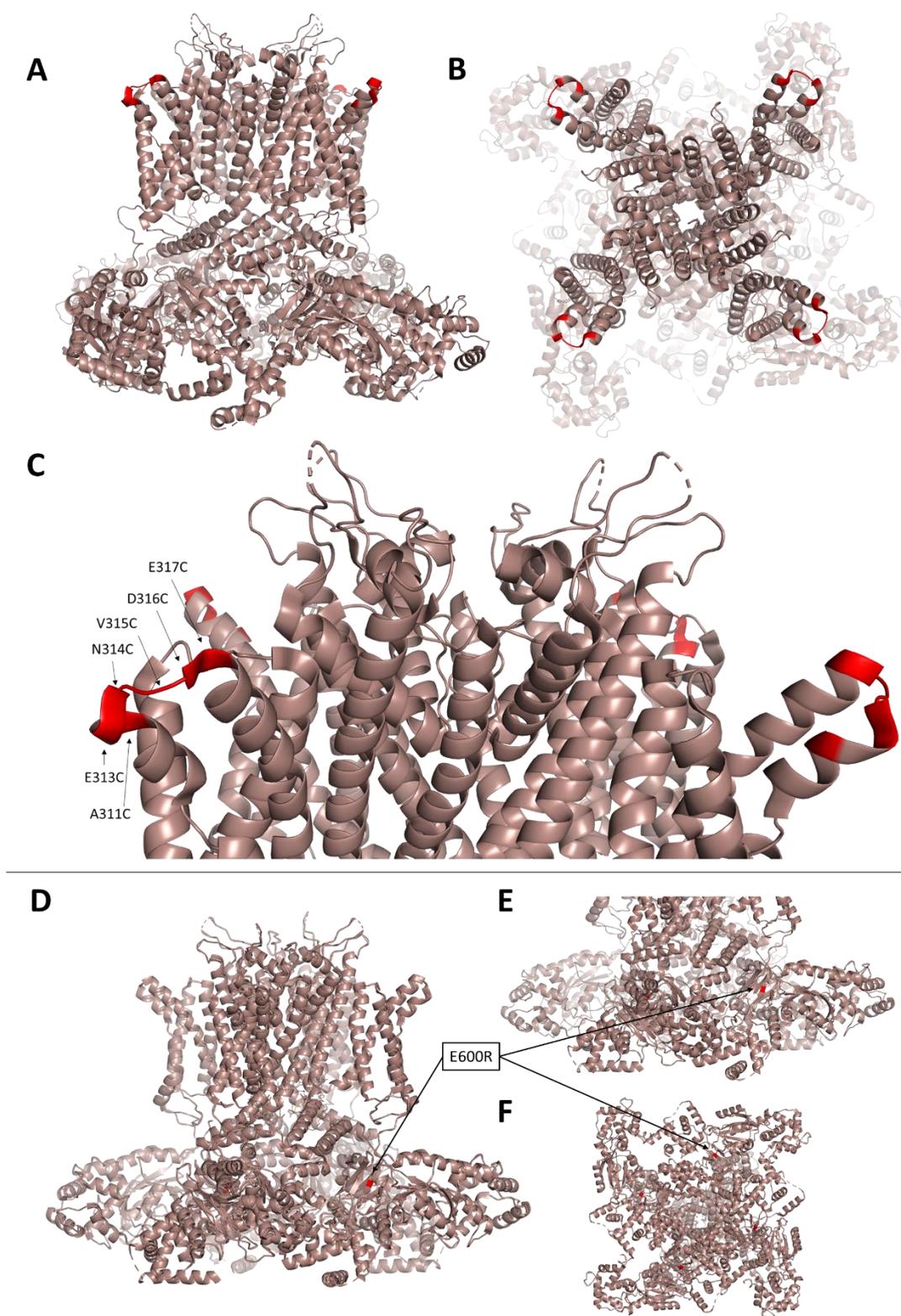
hEAGa      FKTRQNNVAWLVDIVLNFHTTFVGPAGEVISDPKLIRMNYLKTWFVIDL
hEAGb      FKTRQNNVAWLVDIVLNFHTTFVGPAGEVISDPKLIRMNYLKTWFVIDL
*****

hEAGa      LSCLPYDVINAFENVDE-----GISSLFSSLKVVRLLR
hEAGb      LSCLPYDVINAFENVDEVSAFMGDPGKIGFADQIPPPLEGRESQGISSLFSSLKVVRLLR
*****

hEAGa      LGRVARKLDHYIEYGAAVLVLLVCFGLAAHWMACIWYSIGDYEIFDEDTKTIRNNSWLY
hEAGb      LGRVARKLDHYIEYGAAVLVLLVCFGLAAHWMACIWYSIGDYEIFDEDTKTIRNNSWLY
*****

```

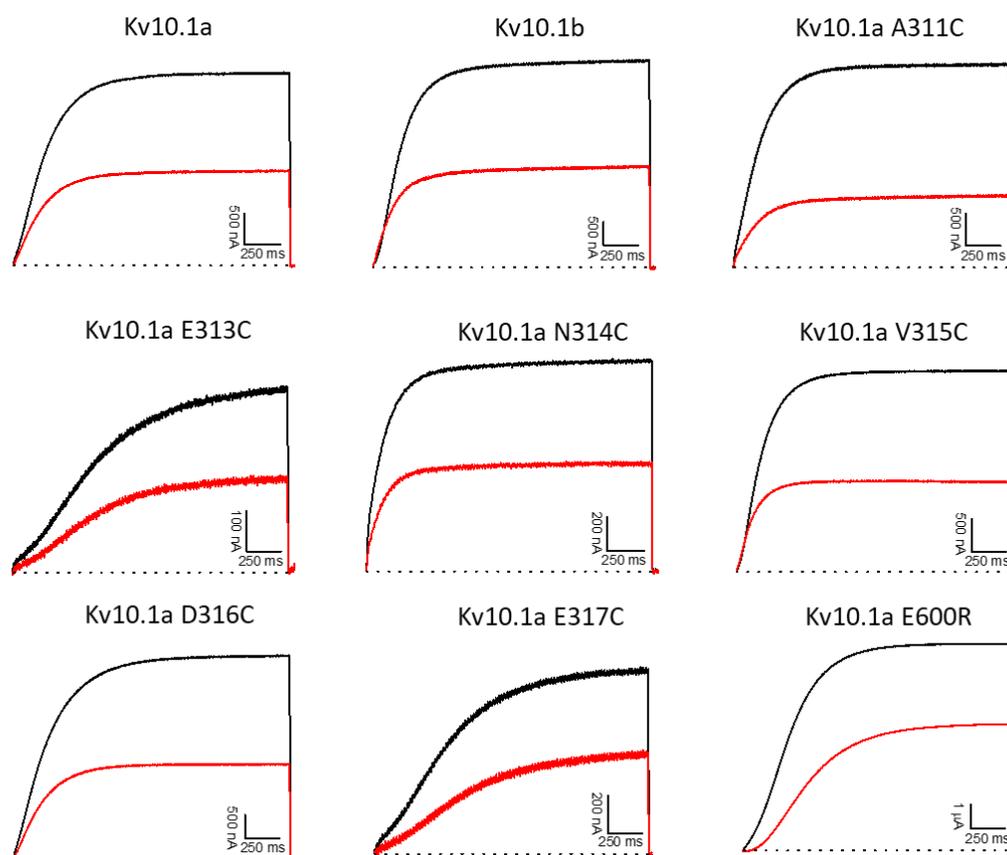
**Figura 62. Alinhamento indicando parte da sequência dos canais Kv10.1a e Kv10.1b.** A sequência do Kv10.1b é idêntica ao Kv10.1a, exceto que o Kv10.1b possui uma parte adicional, que forma um loop extracelular.



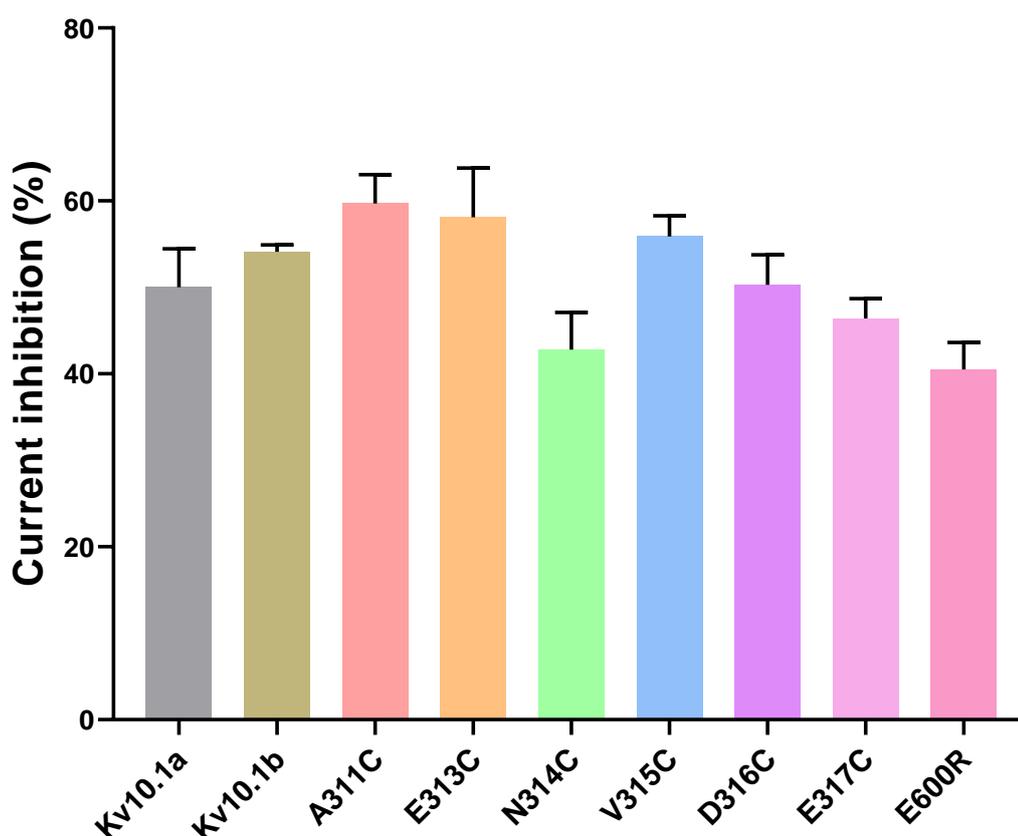
**Figura 63. Mutações realizadas no hEAG1:** visão geral do canal (A), vista superior (B) e com destaque das mutações realizadas na porção S3b-E2-S4 (C). (D), (E) e (F) ilustram a mutação no domínio intracelular do canal, com a visão geral da estrutura, destaque para o domínio intracelular e vista inferior, respectivamente. Os resíduos mutados estão destacados em vermelho.

Buscou-se avaliar a atividade da collineina-1 nesses mutantes de forma a conferir maior credibilidade ao *docking* molecular proposto para a interação desta proteína com o hEAG1 (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2020). Neste modelo, o resíduo Arg79 da collineina-1 bloqueia o poro do canal através com interações com os resíduos de Gly536 de duas subunidades da estrutura. Adicionalmente, outras interações também foram propostas, aumentando a interface de interação da proteína com o canal iônico (Fig. 11). No entanto, todas as interações ocorrem nos domínios S5 e S6, formadores do poro, não sendo proposta nenhuma interação com o domínio sensível à voltagem ou região intracelular.

A forma nativa da collineina-1 foi capaz de inibir todos os mutantes testados, a uma concentração de 5  $\mu\text{M}$ , de maneira semelhante àquela apresentada no hEAG1 nativo (Fig. 64). Os percentuais de inibição para cada mutante (Fig. 65) se encontram próximos àquele obtido para a forma nativa do canal (hEAG1).



**Figura 64. Atividade da collineina-1 (5  $\mu\text{M}$ ) em diferentes mutantes do canal hEAG1.** Os traços pretos representam a condição controle, enquanto os traços vermelhos indicam a corrente obtida após a adição da enzima. A atividade nestes canais foi avaliada utilizando a enzima a uma concentração de 5  $\mu\text{M}$ . Os gráficos ilustram os efeitos obtidos em uma série de três experimentos (n=3).



**Figura 65. Inibição da corrente nos canais mutantes no domínio sensível à voltagem do hEAG1 pela forma nativa da collineina-1.** A atividade nestes canais foi avaliada utilizando a enzima a uma concentração de 5  $\mu$ M. Os gráficos ilustram o efeito médio obtido em uma série de três experimentos, ( $n=3$ )  $\pm$  SEM. SEM: erro padrão da média.

A toxina APETx4, encontrada na anêmona do mar *Anthopleura elegantissima*, caracterizada como um inibidor não seletivo de hEAG1 (MOREELS et al., 2017), também foi testada nos canais com as referidas mutações, com exceção daquele modificado no domínio intracelular (E600R). Os ensaios com esta toxina foram realizados pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Jan Tytgat (Universidade de Leuven, Bélgica). Os dados não foram publicados até o momento, mas estão disponíveis na tese de doutorado de Lien Moreels, 2017.

De maneira antagônica à collineina-1, esta toxina apresenta diferentes porcentagens de inibição, dependendo da mutação realizada no domínio sensível à voltagem, demonstrando que os resíduos presentes na região S3b-E2-S4 (A311, E313, N314 e E317) são fundamentais para a atividade desta toxina no hEAG1. Assim, esta proteína é caracterizada como uma toxina atuante no domínio sensível à voltagem, e não como bloqueadora do poro do canal.

A participação dos resíduos de aminoácidos mutados é evidente na atividade inibitória do APETx4 no canal hEAG1. Entretanto, a ausência de diferenças significativas na porcentagem de inibição dos canais hEAG1 mutantes, pela collineina-1, descarta a participação destes resíduos no mecanismo de inibição deste canal por esta proteína, reforçando o modelo de interação com o vestíbulo do poro, proposto anteriormente no *docking* molecular.

#### 4.6.3.3. Atividade de outras serinoproteases no canal iônico hEAG1

Além da collineina-1, os efeitos de outras serinoproteases foram avaliados no canal hEAG1. Para a realização destes experimentos, as atividades inibitórias da giroxina (uma serinoprotease trombina-símile de *C. d. terrificus*) (Fig. 66A), BjSP (serinoprotease encontrada na peçonha de *B. jararaca*) (Fig. 66B) e quimotripsina bovina (Fig. 66C) também foram avaliadas. De acordo com o alinhamento realizado, empregando a sequências destas estruturas (Fig. 66D), observa-se que a giroxina, BjSP e quimotripsina bovina apresentam, respectivamente, 99%, 61% e 30% de identidade com a collineina-1. A giroxina exibe, em sua estrutura, todos os 20 resíduos de aminoácidos que interagem com o hEAG1, de acordo com o *docking* molecular, enquanto a BjSP apresenta sete dos 20 resíduos e a quimotripsina não possui nenhum destes resíduos responsáveis pelo ancoramento ao canal iônico (Tab. 9).



3%, semelhante à atividade da collineina-1. Por outro lado, a enzima BjSP apresentou uma inibição de  $9,2 \pm 2,1\%$  e a quimotripsina não apresentou atividade inibitória deste canal. Estes resultados sustentam o modelo proposto de interação destas enzimas com o hEAG1 e destacam a participação do resíduo R79, o qual desempenha um papel fundamental no bloqueio deste canal iônico.

A tabela 11 ilustra os resíduos-chave que participam da interação destas enzimas com o canal iônico, demonstrando se eles estão ou não presentes na estrutura das enzimas testadas. Além das diferenças estruturais discutidas anteriormente, apenas a giroxina e collineina-mut apresentam o resíduo R79, ausente nas enzimas BjSP e quimotripsina. A presença deste resíduo aparenta ser uma característica importante para a inibição do hEAG1, uma vez que sua ausência reduz significativamente o percentual de inibição, observado pela BjSP e quimotripsina.

**Tabela 11. Comparação de diferentes serinoproteases em relação à presença de resíduos interagindo com o hEAG1.** O número de cada resíduo está relacionado à sua posição na sequência da collineina-1, de acordo com o alinhamento presente na figura 66.

Resíduo	collineina-1	rCollineina-mut	gyroxina B1.3	BjSP	quimotripsina
Ser25	•	•	•		
Phe26	•	•	•	•	
Arg46	•	•	•		
Lys47	•	•	•		
Lys71	•	•	•	•	
Glu72	•	•	•	•	
Lys73	•	•	•	•	
Tyr74	•	•	•		
Asn77	•	•	•		
Arg79	•	•	•		
Asn80	•	•	•		
Lys84	•	•	•		
Asn95	•	•	•		
Glu133	•	•	•		
Arg153	•	•	•	•	
Ala163	•	•	•	•	
Arg182	•	•	•		
Glu232	•	•	•		
Val234	•	•	•		
Cys236	•	•	•	•	

A caracterização destas moléculas é uma ilustração de um exemplo único e inesperado de uma grande proteína, com atividade enzimática, atuando como um ligante com propriedades moduladoras do canal iônico hEAG1, comparável a um peptídeo neurotóxico. Além da descoberta desta nova atividade de SVSPs, propôs-se também as características estruturais necessárias para que esta atividade esteja presente. Sendo assim, este achado é também relevante no contexto de novas perspectivas sobre o câncer e seu tratamento, envolvendo novos inibidores do hEAG1 baseados na estrutura da collineina-1.

#### **4.7. Avaliação da citotoxicidade das diferentes formas da collineina-1 em células mononucleares de sangue periférico (PBMC)**

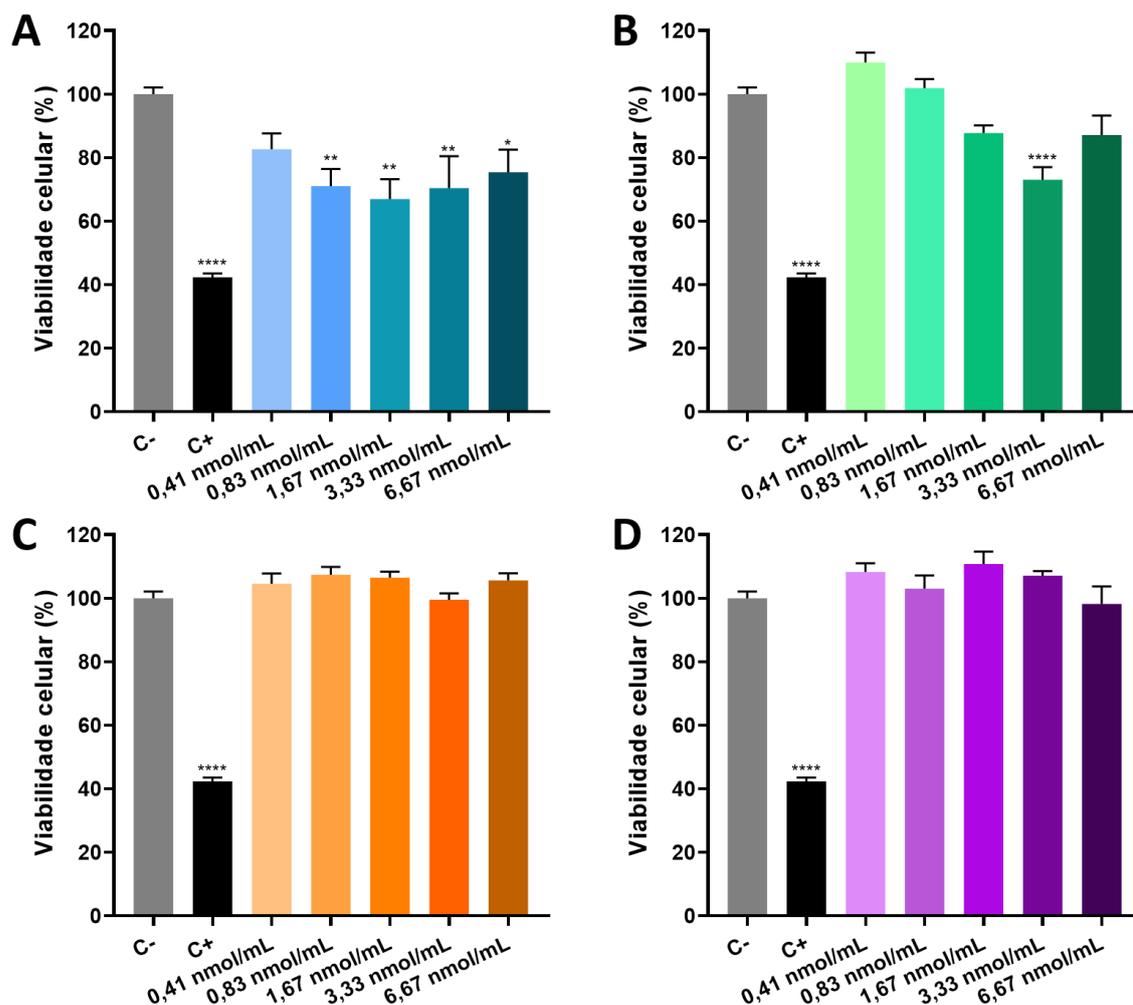
A viabilidade celular é caracterizada como o número de células vivas em uma determinada população, enquanto a medição da quantidade de células em proliferação é usada como um indicador vital para a ação de sobrevivência ou morte celular em resposta a medicamentos ou outros agentes químicos. Os efeitos podem surgir como citotóxicos, que se caracterizam por sua toxicidade e matam as células; ou citostáticos, que são definidos como inibição do crescimento celular. Para diferentes tipos de estudos biológicos, é importante detectar o número de células viáveis em uma determinada população. Os ensaios de citotoxicidade e proliferação celular são fundamentalmente usados para rastrear a resposta das células contra um medicamento ou qualquer outro agente químico (ADAN et al., 2016).

O ensaio de MTT pode ser usado para avaliar a viabilidade celular frente a componentes adicionados no meio de cultura. A técnica fundamenta-se na redução mitocondrial, por desidrogenases e redutases, do composto de cor amarelada (MTT) para o seu metabólito insolúvel em água, formazan, de cor levemente roxa, cuja absorvância é posteriormente lida no comprimento de onda de 490 nm (MOSMANN, 1983). Assim, quanto maior a absorvância, maior a viabilidade celular de determinado grupo estudado.

As concentrações testadas (0,41; 0,83; 1,67; 3,33 e 6,67 nmol/mL) foram escolhidas de modo a ficarem próximas à faixa na qual a collineina-1 apresenta atividade citotóxica em células MCF7 (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2020). Assim, esperava-se determinar se as enzimas nativa e recombinante possuem algum efeito citotóxico nestas concentrações e, ainda, se PEGlação destas moléculas apresenta alguma interferência neste efeito.

Os dados obtidos (Fig. 67) sugerem que a collineina-1 nativa apresenta leve citotoxicidade, mesmo em concentrações mais baixas, enquanto as outras formas da enzima não

apresentaram tal efeito. Na concentração de 1,67 nmol/mL, foi observada uma redução de aproximadamente 30% na viabilidade celular, sendo a concentração que mais afetou a viabilidade celular, fato que não se repetiu para as outras formas da enzima. Além disso, é interessante observar que a PEGlação da proteína nativa diminuiu a sua toxicidade na maioria das concentrações testadas, com exceção da concentração de 3,33 nmol/mL.



**Figura 67.** Viabilidade de células PBMC após exposição a (A) collineina-1; (B) PEG-collineina-1; (C) rCollineina-1 e (D) PEG-rCollineina-1, por 24 h. Dados apresentados em porcentagem de viabilidade celular comparados ao controle negativo (C-). C +: cisplatina (250 µg/mL). (n = 9) ± SEM; SEM: erro padrão da média; \* p<0,01, \*\* p<0,005, \*\*\*\* p<0,001.

A avaliação da citotoxicidade da Russelobin, uma SVSP trombina-símile da serpente *Daboia russelii russelii*, não apresentou atividade citotóxica em estudos histológicos realizados em camundongos (MUKHERJEE e MACKESSY, 2013). De maneira similar, não foi relatada

citotoxicidade nas linhagens celulares HT29 e HeLa pela Brevithrombolase, uma serinoprotease da bactéria *Brevibacillus brevis* (MAJUMDAR et al., 2014). Outros estudos envolvendo serinoproteases de *Bacillus cereus* (BORA et al., 2018) e *Diopatra sugokai* (KIM et al., 2018) também relataram ausência de citotoxicidade destas enzimas em diferentes linhagens celulares.

Diferentemente da collineína-1 e da PEG-collineína-1, a rCollineína-1 e PEG-rCollineína-1 não apresentaram citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas. A forma recombinante da enzima é aquela que apresenta o maior potencial terapêutico como possível biofármaco, devido à facilidade de produção e à quantidade obtida pela expressão heteróloga em *P. pastoris*. Ademais, a PEGilação é uma modificação com prováveis efeitos benéficos na distribuição, biotransformação e eliminação de biofármacos (VILLEGAS et al., 2018). Deste modo, a ausência de citotoxicidade da proteína recombinante PEGlada é um resultado importante na busca da aplicabilidade terapêutica desta proteína.

#### 4.8. Predição *in silico* de determinantes antigênicos

A identificação de epítomos relevantes na estrutura de proteínas, reconhecidos por linfócitos T, pode auxiliar no aprimoramento de estratégias de desenvolvimento de novos biofármacos, a fim de diminuir a produção de anticorpos neutralizantes, os quais podem diminuir a atividade terapêutica da proteína *in vivo* (SHARON et al., 2014). De acordo com a sua estrutura, os epítomos reconhecidos pelos linfócitos T podem ser classificados em dois tipos: linear e conformacional.

Os epítomos lineares compreendem uma sequência contínua de aminoácidos na estrutura da proteína. Por outro lado, os epítomos conformacionais levam em consideração sua estrutura terciária e/ou quaternária, podendo envolver regiões diferentes e/ou descontínuas (BARLOW et al., 1986). É possível predizer epítomos lineares através de análises *in silico* da sequência de determinada proteína empregando algoritmos que levam em consideração as propriedades estruturais e físico-químicas dos aminoácidos, como hidrofobicidade, flexibilidade, polaridade, antigenicidade e acessibilidade na superfície da proteína (CHEN et al., 2007; EL-MANZALAWY et al., 2008).

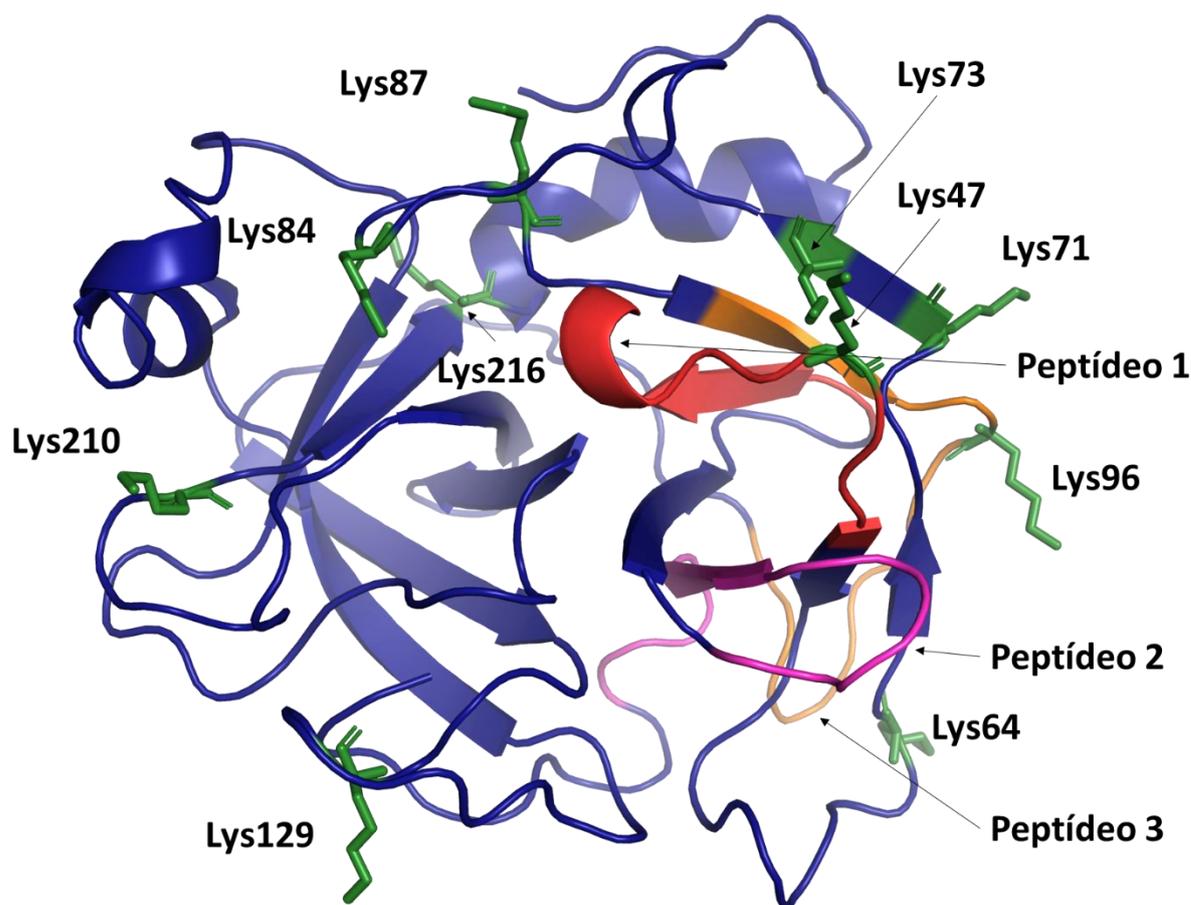
Apesar de as serinoproteases apresentarem enovelamento semelhante, suas estruturas secundárias diferem nas voltas próximas ao sítio ativo, variando a topografia molecular e a distribuição de cargas na interface catalítica (ULLAH et al., 2013). Desta maneira, embora

apresentem semelhanças estruturais, a imunogenicidade destas proteínas pode variar, de acordo com suas características.

A tabela 12 apresenta dez peptídeos potencialmente imunogênicos, classificados de acordo com a sua pontuação pela ferramenta utilizada. Os epítomos que obtiveram as três maiores pontuações foram destacados na estrutura da collineína-1, obtida através do processo de modelagem estrutural (Fig. 68).

**Tabela 12. Possíveis peptídeos imunogênicos na sequência da rCollineína-1.** Os peptídeos foram classificados de acordo com a pontuação obtida na ferramenta utilizada (*Epitope Prediction and Analysis Tools, IEDB Analysis Resource*). A maior pontuação do peptídeo indica uma maior probabilidade do mesmo ser imunogênico. Os peptídeos marcados (seta) foram destacados na estrutura tridimensional da enzima (Fig. 68).

Classificação	Sequência	Localização	Pontuação
→ 1	EWVLTAAHCDRKHIL	36-50	19,51
→ 2	EHNFLVALYEYWSQS	11-25	18,87
3	TLINGEWVLTAAHCD	31-45	15,45
→ 4	LIRLNKPVSYSEHIA	91-105	12,7
5	LPATIRILCAGVLEG	161-175	12,22
6	IYVGVHDSVQFDKE	51-65	11,29
7	KEYYFNCRNNFTKW	71-85	9,47
8	DKDIMLIRLNKPVSY	86-100	2,77
9	RKHILYVGVHDSV	46-60	2,42
10	HPQFRLPATIRILCA	159-170	1,59



**Figura 68. Modelagem da estrutura da collineina-1 com destaque dos prováveis sítios de PEGlação e possíveis peptídeos imunogênicos.** Segmentos destacados (vermelho, magenta e laranja) são os peptídeos classificados com maior probabilidade de serem imunogênicos. Resíduos destacados em verde: possíveis sítios de PEGlação presentes na sequência de aminoácidos da collineina-1 (resíduos de lisina).

Os peptídeos com as maiores classificações de imunogenicidade estão presentes nas porções mais externas da enzima, em contato direto com o meio externo, característica comum para peptídeos imunogênicos (RUBINSTEIN et al., 2008). Dados na literatura sugerem que a maioria dos epítomos possui entre 15 a 25 resíduos de aminoácidos, presentes em uma área de 600 a 1000 Å<sup>2</sup>, organizados em *loops* (POTOCNAKOVA et al., 2016), características que também estão presentes nos epítomos marcados na estrutura da collineina-1.

É interessante apontar que os peptídeos destacados na estrutura se encontram próximos a possíveis sítios de PEGlação (resíduos de lisina). Este dado pode fundamentar a redução da imunogenicidade obtida após a PEGlação da proteína recombinante, discutida no item 4.9.

Supõe-se que esta modificação estrutural pode ocultar estes epítomos, diminuindo a sua acessibilidade às células do sistema imune, bem como a área exposta na superfície da proteína.

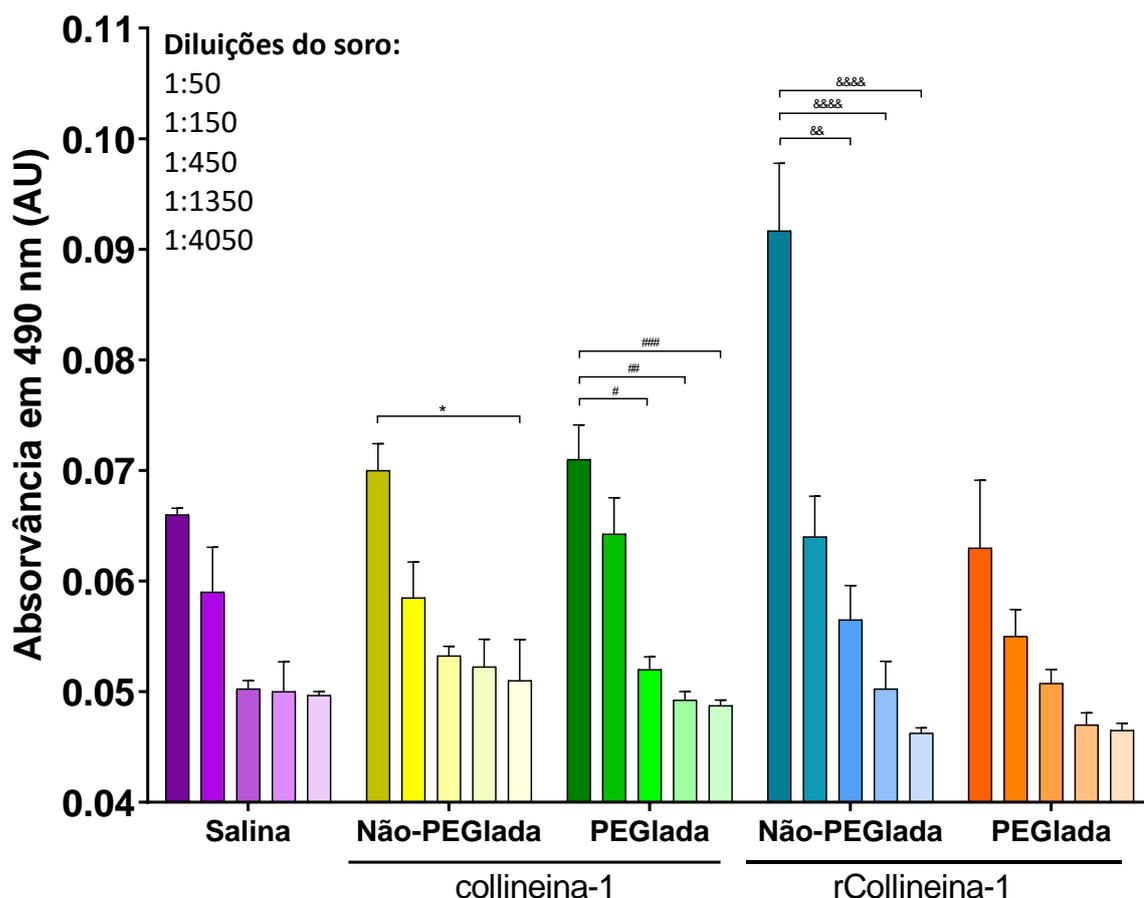
#### 4.9. Imunogenicidade das diferentes formas da collineína-1 em camundongos

Potencialmente, todas as proteínas terapêuticas podem provocar uma resposta imune com a consequente produção de anticorpos contra o medicamento (ADAs – *Anti-drug antibodies*) (GARCES e DEMENGEOT, 2018). A imunogenicidade de peptídeos e proteínas candidatos a biofármacos é um dos principais desafios nas etapas de desenvolvimento, obtenção da licença e comercialização de um novo medicamento (SAUNA et al., 2018). Neste contexto, a avaliação da imunogenicidade das diferentes formas da collineína-1 é um dos principais objetivos deste trabalho.

Durante esta avaliação, a dose de proteína utilizada em cada etapa de imunização foi estabelecida de modo a ser metade daquela que causa a incoagulabilidade sanguínea em camundongos (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2019). Deste modo, 2 nmol de cada proteína foram administrados nos animais de cada grupo, a cada imunização.

Embora a análise *in silico* de possíveis epítomos na estrutura mostrou possíveis peptídeos potencialmente imunogênicos para a collineína-1 e rCollineína-1 (item 4.8), os dados de imunogenicidade *in vivo* apontam para uma baixa imunogenicidade destas proteínas, mesmo para as formas não-PEGladas. Ao compararmos a produção de anticorpos das quatro formas da proteína (collineína-1, rCollineína-1, PEG-collineína-1 e PEG-rCollineína-1) com o grupo controle (Fig. 69), observamos que nenhum dos grupos tratados com as enzimas produziu uma quantidade estatisticamente relevante de anticorpos.

Entretanto, analisando os dados é possível notar que a forma recombinante não-PEGlada (rCollineína-1) desencadeou uma produção de anticorpos ligeiramente maior do que as outras formas da enzima, apesar de não ter significância estatística. Supõe-se que este aumento na imunogenicidade desta proteína esteja associado à diferença do padrão de glicosilação realizado pela levedura *P. pastoris* (BRETTHAUER, 2003; PUXBAUM et al., 2015). Por ser um padrão de glicosilação diferente daquele efetuado por células humanas, o sistema imune pode reconhecer estes carboidratos como epítomos e desencadear, assim, uma resposta imune contra a proteína (CHOI et al., 2003; LIU et al., 2018).



**Figura 69.** Análise da produção de anticorpos totais em camundongos após a aplicação de salina (C-), collineina-1, PEG-collineina-1, rCollineina-1 e PEG-rCollineina-1. Cada grupo apresenta os dados das cinco diluições do soro dos animais (cores mais intensas para cores mais leves, em sequência: 1:50; 1:150; 1:450; 1:1350 e 1:4050). \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,005$ ; && $p < 0,005$ ; &&&& $p < 0,0001$  ( $n = 5$  animais por grupo). Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

Além do padrão diferente de glicosilação da rCollineina-1, a presença da cauda de histidina também foi considerada como um possível peptídeo imunogênico. Entretanto, seu pequeno tamanho (0,84 Da) e ausência de atividade biológica contribuem para que esta porção da proteína tenha pequena contribuição para sua imunogenicidade (TERPE, 2003; KIMPLE et al., 2013; ZHAO et al., 2013). Do mesmo modo, também não foram observadas mudanças estruturais significativas em diversas proteínas fundidas à diferentes *tags*, incluindo a cauda de poli-histidina (CARSON et al., 2007). Ademais, a predição *in silico* de possíveis epítomos não apresentou esta porção da proteína como um possível peptídeo imunogênico.

Por outro lado, as formas PEGladas da enzima, tanto em sua forma nativa (PEG-collineina-1) quanto recombinante (PEG-rCollineina-1), não apresentaram produção

significativa de anticorpos. A diminuição da imunogenicidade após a PEGlação fica ainda mais evidente quando se compara a produção de anticorpos induzida pela rCollineína-1 com aquela apresentada pela PEG-rCollineína-1.

Recentemente, uma serinoprotease recombinante de *Bothrops atrox moojeni*, produzida em *P. pastoris* (YOU et al., 2004), teve sua imunogenicidade testada em humanos. Esta proteína, assim como a collineína-1, é capaz de clivar a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio, reduzindo sua concentração plasmática. A proteína, em sua forma recombinante, apresenta 33 kDa e atividades *in vitro* semelhantes àsquelas encontradas para a sua forma nativa. Os testes em humanos mostraram que a proteína diminuiu os níveis de fibrinogênio circulante e foi bem tolerada na faixa de dose entre 2,5 a 10 BU/2 mL, por todos os indivíduos presentes no estudo. Não foram encontradas mudanças significativas em testes bioquímicos, eletrocardiogramas e pressão arterial dos pacientes, sugerindo que a proteína recombinante pode ser bem tolerada a longo prazo e apresenta potencial para o desenvolvimento de um agente eficaz no tratamento de distúrbios hemostáticos em humanos (CHOI et al., 2018).

Embora a produção de anticorpos pela forma recombinante não-PEGlada tenha sido pequena, sem relevância estatística, sua forma PEGlada não apresentou aumento de imunogenicidade, comparada com os animais do grupo controle (salina). Esta diminuição de imunogenicidade por proteínas PEGladas já foi descrita na literatura (MARSHALL et al., 1996; WAN, XUE et al., 2017; WU et al., 2017; XU et al., 2017; SHIMIZU et al., 2018; THI NGUYEN et al., 2018), sendo uma das principais vantagens dessa forma de modificação de proteínas e peptídeos voltados à produção de biofármacos. Deste modo, este resultado reforça o apelo biotecnológico e terapêutico da PEGlação desta serinoprotease, visando suas futuras aplicações.

---

## **CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS**

## 5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

SVSPs são enzimas relevantes presentes em diversas peçonhas, possuindo a capacidade de interferir em diversas funções fisiológicas, como as vias da coagulação, fibrinólise, mecanismos de controle da pressão arterial e agregação plaquetária. Por conta das suas propriedades funcionais e bioquímicas, estas enzimas são consideradas promissores agentes terapêuticos, a serem empregados em condições de distúrbios nas vias da coagulação sanguínea.

A PEGlação de proteínas tem sido usada no desenvolvimento de novos medicamentos há mais de 30 anos, como estratégia para diminuir a imunogenicidade e aprimorar as propriedades farmacocinéticas de biofármacos. Todavia, seu uso permanece limitado na área da toxilogia, especialmente envolvendo toxinas de peçonhas de serpente.

A collineína-1, encontrada na peçonha de *C. d. collilineatus*, é uma SVSP com atividade fibrinogenolítica, além de atuar no canal iônico hEAG1, superexpresso em diversas linhagens cancerígenas (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2015; 2019; 2020). O presente trabalho desenvolveu uma nova metodologia de purificação da forma recombinante desta enzima (rCollineína-1), além de ter padronizado o processo de PEGlação e purificação das suas formas nativa e recombinante PEGladas (PEG-collineína-1 e PEG-rCollineína-1, respectivamente).

A análise estrutural das quatro formas da enzima mostrou que a PEGlação não altera de forma significativa o conteúdo de estruturas secundárias das proteínas nativa e recombinante, mantendo sua integridade estrutural. As formas PEGladas da enzima também compartilham características cinéticas e funcionais semelhantes àquelas encontradas em suas formas não-PEGladas, mantendo sua capacidade de degradação do fibrinogênio. Por outro lado, essa modificação reduziu significativamente a capacidade de inibição destas enzimas no canal iônico hEAG1.

No contexto da caracterização citotóxica em células PBMC humanas, observou-se que as formas PEGladas não causaram diminuição da viabilidade celular, mesmo em altas concentrações. Em respeito à avaliação imunogênica, a análise *in silico* destas proteínas indicou prováveis epítomos na superfície da proteína. Entretanto, nas análises de imunogenicidade *in vivo*, a collineína-1 não apresentou imunogenicidade significativa, enquanto a rCollineína-1 apresentou uma pequena produção de anticorpos, apesar de não ter mostrado diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo. Por outro lado, as formas PEGladas da enzima não apresentaram nenhuma evidência de imunogenicidade. Este resultado

destaca a importância da PEGlação em diminuir a imunogenicidade de proteínas com potencial aplicação no âmbito clínico.

Desta maneira, este trabalho contribuiu de forma significativa no desenvolvimento e padronização de técnicas de produção, purificação e PEGlação da collineína-1 recombinante, aumentando a potencial aplicação terapêutica desta proteína. A PEGlação direcionou a atividade biológica para o controle da hemostasia, ampliando suas possibilidades de ser empregada como agente defibrinogenante em condições relacionadas a desequilíbrios neste sistema, como acidente vascular cerebral, trombose e embolia pulmonar. Assim, os resultados obtidos até o momento abrem novos caminhos e perspectivas para o estudo desta enzima, buscando compreender seu comportamento farmacocinético e farmacodinâmico *in vivo*, bem como avaliar a capacidade de degradação do fibrinogênio em estudos pré-clínicos em animais, buscando, no futuro, a aplicação terapêutica desta enzima para uso em humanos.

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 2, p. 213-21, 2010.

ADAN, A.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 17, n. 14, p. 1213-1221, 2016.

AEBI, M. N-linked protein glycosylation in the ER. **Biochim Biophys Acta**, v. 1833, n. 11, p. 2430-7, 2013.

AGYEI, D. et al. Protein and Peptide Biopharmaceuticals: An Overview. **Protein and Peptide Letters**, v. 24, n. 2, p. 94-101, 2017.

AMICONI, G. et al. A novel venombin B from agkistrodon contortrix contortrix: evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from thrombin. **Biochemistry**, v. 39, n. 33, p. 10294-308, 2000.

AMORIM, F. G. et al. Microbial production of toxins from the scorpion venom: properties and applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 102, n. 15, p. 6319-6331, 2018.

ANDERSEN, D. C.; KRUMMEN, L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. **Curr Opin Biotechnol**, v. 13, n. 2, p. 117-23, 2002.

ARCANGELI, A.; BECCHETTI, A. hERG Channels: From Antitargets to Novel Targets for Cancer Therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 1, p. 3-5, 2017.

ARCANGELI, A.; YUAN, J. X. American Journal of Physiology-Cell Physiology theme: ion channels and transporters in cancer. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 301, n. 2, p. C253-4, 2011.

ARUNKUMAR, A. I. et al. Acetonitrile-induced conformational transitions in poly-L-lysine. **Int J Biol Macromol**, v. 21, n. 4, p. 299-305, 1997.

ASHER, V. et al. Eag and HERG potassium channels as novel therapeutic targets in cancer. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 8, 2010.

ASHER, V. et al. The role of Eag and HERG channels in cell proliferation and apoptotic cell death in SK-OV-3 ovarian cancer cell line. **Cancer Cell Int**, v. 11, p. 6, 2011.

ASSIRI, A. A. et al. MicroRNA 362-3p Reduces hERG-related Current and Inhibits Breast Cancer Cells Proliferation. **Cancer Genomics Proteomics**, v. 16, n. 6, p. 433-442, 2019.

BANDARANAYAKE, A. D.; ALMO, S. C. Recent advances in mammalian protein production. **FEBS Lett**, v. 588, n. 2, p. 253-60, 2014.

BARLOW, D. J.; EDWARDS, M. S.; THORNTON, J. M. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. **Nature**, v. 322, n. 6081, p. 747-8, 1986.

- BAUER, C. K.; SCHWARZ, J. R. Ether-a-go-go K(+) channels: effective modulators of neuronal excitability. **J Physiol**, v. 596, n. 5, p. 769-783, 2018.
- BAUMGARTNER, W.; ISLAS, L.; SIGWORTH, F. J. Two-microelectrode voltage clamp of *Xenopus* oocytes: voltage errors and compensation for local current flow. **Biophys J**, v. 77, n. 4, p. 1980-91, 1999.
- BENDER, N. K. et al. Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. **Rheumatol Int**, v. 27, n. 3, p. 269-74, 2007.
- BENDTZEN, K. Anti-TNF-alpha biotherapies: perspectives for evidence-based personalized medicine. **Immunotherapy**, v. 4, n. 11, p. 1167-79, 2012.
- BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343-50, 2011.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Biochemistry. 5th. **New York: WH Freeman**, v. 38, n. 894, p. 76, 2002.
- BERLEC, A.; STRUKELJ, B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 40, n. 3-4, p. 257-74, 2013.
- BERNECHE, S.; ROUX, B. A gate in the selectivity filter of potassium channels. **Structure**, v. 13, n. 4, p. 591-600, 2005.
- BERTHELEME, N. et al. Heterologous expression of G-protein-coupled receptors in yeast. **Methods Enzymol**, v. 556, p. 141-64, 2015.
- BEZRUKOV, S. M.; KASIANOWICZ, J. J. The charge state of an ion channel controls neutral polymer entry into its pore. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters**, v. 26, n. 6, p. 471-476, 1997.
- BEZRUKOV, S. M. et al. Dynamics and free energy of polymers partitioning into a nanoscale pore. **Macromolecules**, v. 29, n. 26, p. 8517-8522, 1996.
- BOCCU, E.; VELO, G. P.; VERONESE, F. M. Pharmacokinetic properties of polyethylene glycol derivatized superoxide dismutase. **Pharmacol Res Commun**, v. 14, n. 2, p. 113-20, 1982.
- BOIVIN, S.; KOZAK, S.; MEIJERS, R. Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. **Protein Expression and Purification**, v. 91, n. 2, p. 192-206, 2013.
- BOLDRINI-FRANCA, J. et al. Minor snake venom proteins: Structure, function and potential applications. **Biochim Biophys Acta**, v. 1861, n. 4, p. 824-838, 2017.

BOLDRINI-FRANCA, J. et al. Snake venomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **J Proteomics**, v. 73, n. 9, p. 1758-76, 2010.

BOLDRINI-FRANCA, J.; PINHEIRO-JUNIOR, E. L.; ARANTES, E. C. Functional and biological insights of rCollinein-1, a recombinant serine protease from *Crotalus durissus collilineatus*. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 25, 2019.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Beyond hemostasis: a snake venom serine protease with potassium channel blocking and potential antitumor activities. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 4476, 2020.

BOLDRINI-FRANCA, J. et al. *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: analysis of gene expression profile. **Biochimie**, v. 91, n. 5, p. 586-95, 2009.

BOLDRINI-FRANCA, J. et al. Expression of a new serine protease from *Crotalus durissus collilineatus* venom in *Pichia pastoris* and functional comparison with the native enzyme. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2015.

BON, C. et al. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta Physiol Pharmacol Latinoam**, v. 39, n. 4, p. 439-48, 1989.

BORA, B. et al. The N-terminal-truncated recombinant fibrin(ogen)olytic serine protease improves its functional property, demonstrates in vivo anticoagulant and plasma defibrinogenation activity as well as pre-clinical safety in rodent model. **Int J Biol Macromol**, v. 111, p. 462-474, 2018.

BORDON, K. C. F. et al. From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. **Front Pharmacol**, v. 11, p. 1132, 2020.

BRAKE, A. J. et al. Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 15, p. 4642-6, 1984.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 851-9, 2000.

BRETTTHAUER, R. K. Genetic engineering of *Pichia pastoris* to humanize N-glycosylation of proteins. **Trends Biotechnol**, v. 21, n. 11, p. 459-62, 2003.

BRETTTHAUER, R. K.; CASTELLINO, F. J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 30 ( Pt 3), p. 193-200, 1999.

BUI, H. H. et al. Automated generation and evaluation of specific MHC binding predictive tools: ARB matrix applications. **Immunogenetics**, v. 57, n. 5, p. 304-14, 2005.

CANCHI, D. R.; GARCIA, A. E. Cosolvent effects on protein stability. **Annu Rev Phys Chem**, v. 64, p. 273-93, 2013.

CARBONE, E.; MORI, Y. Ion channelopathies to bridge molecular lesions, channel function, and clinical therapies. **Pflugers Arch**, v. 472, n. 7, p. 733-738, 2020.

CARDOSO, J. O. L. C. **Animais peçonhentos no Brasil : biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1a. São Paulo, Brasil: Sarvier : FAPESP, 2003. 468 p. ISBN 8573781335.

CARNEVALE, V.; KLEIN, M. L. Small molecule modulation of voltage gated sodium channels. **Curr Opin Struct Biol**, v. 43, p. 156-162, 2017.

CARSON, M. et al. His-tag impact on structure. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 63, n. Pt 3, p. 295-301, 2007.

CATTERALL, W. A. The molecular basis of neuronal excitability. **Science**, v. 223, n. 4637, p. 653-61, 1984.

\_\_\_\_\_. Structure and function of voltage-gated ion channels. **Annu Rev Biochem**, v. 64, p. 493-531, 1995.

\_\_\_\_\_. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, v. 26, n. 1, p. 13-25, 2000.

CATTERALL, W. A. et al. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon**, v. 49, n. 2, p. 124-41, 2007.

CATTERALL, W. A.; LENAUEUS, M. J.; GAMAL EL-DIN, T. M. Structure and Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 60, p. 133-154, 2020.

CAZARES-ORDONEZ, V.; PARDO, L. A. Kv10.1 potassium channel: from the brain to the tumors. **Biochem Cell Biol**, v. 95, n. 5, p. 531-536, 2017.

CELIK, E.; CALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnol Adv**, v. 30, n. 5, p. 1108-18, 2012.

CESTELE, S.; CATTERALL, W. A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 883-92, 2000.

CHAGA, G. S. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. **J Biochem Biophys Methods**, v. 49, n. 1-3, p. 313-34, 2001.

CHAKRABORTY, H.; LENTZ, B. R. A Simple Method for Correction of Circular Dichroism Spectra Obtained from Membrane-Containing Samples. **Biochemistry**, v. 51, n. 5, p. 1005-1008, 2012.

CHANG, C. C.; TSENG, K. H. Effect of crotamine, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. **Br J Pharmacol**, v. 63, n. 3, p. 551-9, 1978.

- CHAPMAN, A. P. PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54, n. 4, p. 531-45, 2002.
- CHAVEZ-LOPEZ, M. D. et al. Astemizole-based anticancer therapy for hepatocellular carcinoma (HCC), and Eag1 channels as potential early-stage markers of HCC. **Tumor Biology**, v. 36, n. 8, p. 6149-6158, 2015.
- CHEN, J. et al. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. **Amino Acids**, v. 33, n. 3, p. 423-428, 2007.
- CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 1, p. 12-21, 2010.
- CHIU, P. J. et al. Validation of a [3H]astemizole binding assay in HEK293 cells expressing HERG K<sup>+</sup> channels. **J Pharmacol Sci**, v. 95, n. 3, p. 311-9, 2004.
- CHOE, S. Potassium channel structures. **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 2, p. 115-21, 2002.
- CHOI, B. K. et al. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 9, p. 5022-5027, 2003.
- CHOI, S. K. et al. Coagulant Effect and Tolerability of Yeast-Produced Recombinant Batroxobin in Healthy Adult Subjects. **Clin Drug Investig**, v. 38, n. 9, p. 829-835, 2018.
- CHUANG, G. Y. et al. Computational prediction of N-linked glycosylation incorporating structural properties and patterns. **Bioinformatics**, v. 28, n. 17, p. 2249-55, 2012.
- CLAIRFEUILLE, T. et al. Voltage-gated sodium channels viewed through a structural biology lens. **Curr Opin Struct Biol**, v. 45, p. 74-84, 2016.
- CLARKE, J. T. Simplified "Disc" (Polyacrylamide Gel) Electrophoresis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 121, p. 428-36, 1964.
- COHEN, S. N. et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 70, n. 11, p. 3240-4, 1973.
- COLE, K. S. Dynamic Electrical Characteristics of the Squid Axon Membrane. **Archives Des Sciences Physiologiques**, v. 3, n. 2, p. 253-258, 1949.
- COLOGNA, C. T. et al. Investigation of the relationship between the structure and function of Ts2, a neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom. **FEBS J**, v. 279, n. 8, p. 1495-504, 2012.
- COSTA, F. L. et al. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 725-35, 2009.
- DA-SILVA-FREITAS, D.; BOLDRINI-FRANCA, J.; ARANTES, E. C. PEGylation: a successful approach to improve the biopharmaceutical potential of snake venom thrombin-like serine protease. **Protein Pept Lett**, v. 22, n. 12, p. 1133-9, 2015.

- DALY, R.; HEARN, M. T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **J Mol Recognit**, v. 18, n. 2, p. 119-38, 2005.
- DE LERA RUIZ, M.; KRAUS, R. L. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. **J Med Chem**, v. 58, n. 18, p. 7093-118, 2015.
- DEKHIL, H. et al. Molecular cloning and expression of a functional snake venom serine proteinase, with platelet aggregating activity, from the *Cerastes cerastes viper*. **Biochemistry**, v. 42, n. 36, p. 10609-18, 2003.
- DEUIS, J. R. et al. The pharmacology of voltage-gated sodium channel activators. **Neuropharmacology**, 2017.
- DOERNER, K. C.; WHITE, B. A. Detection of Glycoproteins Separated by Nondenaturing Polyacrylamide-Gel Electrophoresis Using the Periodic Acid-Schiff Stain. **Analytical Biochemistry**, v. 187, n. 1, p. 147-150, 1990.
- DOYLE, D. A. et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. **Science**, v. 280, n. 5360, p. 69-77, 1998.
- DOZIER, J. K.; DISTEFANO, M. D. Site-Specific PEGylation of Therapeutic Proteins. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 10, p. 25831-64, 2015.
- EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **Eur J Biochem**, v. 1, n. 1, p. 80-91, 1967.
- EL-MANZALAWY, Y.; DOBBS, D.; HONAVAR, V. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. **Journal of Molecular Recognition**, v. 21, n. 4, p. 243-255, 2008.
- EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 4, p. 486-501, 2010.
- ERICKSON, H. P. Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. **Biological Procedures Online**, v. 11, n. 1, p. 32-51, 2009.
- EZBAN, M.; HANSEN, M.; KJALKE, M. An overview of turoctocog alfa pegol (N8-GP; ESPEROCT((R)) ) assay performance: Implications for postadministration monitoring. **Haemophilia**, v. 26, n. 1, p. 156-163, 2020.
- FEDERICO, R. et al. Histaminase PEGylation: preparation and characterization of a new bioconjugate for therapeutic application. **J Control Release**, v. 115, n. 2, p. 168-74, 2006.
- FEREBEE, R. et al. Light Scattering Analysis of Mono- and Multi-PEGylated Bovine Serum Albumin in Solution: Role of Composition on Structure and Interactions. **J Phys Chem B**, v. 120, n. 20, p. 4591-9, 2016.

- FERREDAMARE, A. R.; BURLEY, S. K. Use of Dynamic Light-Scattering to Assess Crystallizability of Macromolecules and Macromolecular Assemblies (Vol 2, Pg 357, 1994). **Structure**, v. 2, n. 6, p. 567-567, 1994.
- FRANCISCHETTI, I. M. et al. Convulxin, a potent platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom, specifically binds to platelets. **Toxicon**, v. 35, n. 8, p. 1217-28, 1997.
- FREITAS DDA, S.; ABRAHAO-NETO, J. Biochemical and biophysical characterization of lysozyme modified by PEGylation. **Int J Pharm**, v. 392, n. 1-2, p. 111-7, 2010.
- FREITAS DDA, S. et al. Biochemical and biopharmaceutical properties of PEGylated uricase. **Int J Pharm**, v. 387, n. 1-2, p. 215-22, 2010.
- FUX, J. E. et al. Eukaryotic Voltage-Gated Sodium Channels: On Their Origins, Asymmetries, Losses, Diversification and Adaptations. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 2018.
- GARCES, S.; DEMENGEOT, J. The Immunogenicity of Biologic Therapies. **Curr Probl Dermatol**, v. 53, p. 37-48, 2018.
- GASKIN, D. J.; RICHARD, P. The economic costs of pain in the United States. **J Pain**, v. 13, n. 8, p. 715-24, 2012.
- GASSER, B.; MATTANOVICH, D. A yeast for all seasons—Is *Pichia pastoris* a suitable chassis organism for future bioproduction? **FEMS microbiology letters**, v. 365, n. 17, p. fny181, 2018.
- GAVEL, Y.; VON HEIJNE, G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. **Protein Eng**, v. 3, n. 5, p. 433-42, 1990.
- GEFEN, T. et al. The impact of PEGylation on protein immunogenicity. **Int Immunopharmacol**, v. 15, n. 2, p. 254-9, 2013.
- GEKKO, K. et al. Acetonitrile-protein interactions: amino acid solubility and preferential solvation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1387, n. 1-2, p. 195-205, 1998.
- GHORBANPUR, M. et al. PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A COAGULANT SERINE PROTEASE FROM THE VENOM OF THE IRANIAN SNAKE *Agkistrodon halys*. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. 411-423, 2009.
- GLASSMEIER, G. et al. Inhibition of HERG1 K<sup>+</sup> channel protein expression decreases cell proliferation of human small cell lung cancer cells. **Pflugers Arch**, v. 463, n. 2, p. 365-76, 2012.
- GOLDIN, A. L. Resurgence of sodium channel research. **Annu Rev Physiol**, v. 63, p. 871-94, 2001.
- GREENFIELD, N.; FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4108-16, 1969.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876-2890, 2006.

GREENWALD, R. B. et al. Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 2, p. 217-250, 2003.

GUEDES, H. L. et al. Structural characterization and low-resolution model of BJ-48, a thrombin-like enzyme from *Bothrops jararacussu* venom. **Biophys Chem**, v. 132, n. 2-3, p. 159-64, 2008.

GUO, L. et al. Biophysical and biological characterization of PEGylated recombinant human endostatin. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 46, n. 10, p. 920-927, 2019.

GURKAN, C.; ELLAR, D. J. Recombinant production of bacterial toxins and their derivatives in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 4, p. 1-8, 2005.

GUTMAN, G. A. et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 4, p. 473-508, 2005.

HABERMANN, E.; BREITHAUPT, H. Mini-review. The crotoxin complex--an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**, v. 16, n. 1, p. 19-30, 1978.

HALFON, S.; CRAIK, C. S. Introduction: serine peptidases and their clans: Handbook of proteolytic enzymes. In: (Ed.). **Handbook of proteolytic enzymes**: Academic Press, London, 1998, v.3-4, 1998.

HALL, C. E.; SLAYTER, H. S. The fibrinogen molecule: its size, shape, and mode of polymerization. **J Biophys Biochem Cytol**, v. 5, n. 1, p. 11-6, 1959.

HE, S. et al. HERG channel and cancer: A mechanistic review of carcinogenic processes and therapeutic potential. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer**, p. 188355, 2020.

HEBERT, D. N.; GARMAN, S. C.; MOLINARI, M. The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. **Trends Cell Biol**, v. 15, n. 7, p. 364-70, 2005.

HIMMEL, H. M. Suitability of commonly used excipients for electrophysiological in-vitro safety pharmacology assessment of effects on hERG potassium current and on rabbit Purkinje fiber action potential. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 56, n. 2, p. 145-58, 2007.

HOANG THI, T. T. et al. The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation. **Polymers (Basel)**, v. 12, n. 2, 2020.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. **J Physiol**, v. 117, n. 4, p. 500-44, 1952.

- HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F.; KATZ, B. Measurement of Current-Voltage Relations in the Membrane of the Giant Axon of Loligo. **Journal of Physiology-London**, v. 116, n. 4, p. 424-448, 1952.
- HOHENBLUM, H. et al. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnol Bioeng**, v. 85, n. 4, p. 367-75, 2004.
- HUMPHRIES, E. S. A.; DART, C. Neuronal and Cardiovascular Potassium Channels as Therapeutic Drug Targets: Promise and Pitfalls. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 9, p. 1055-1073, 2015.
- IMBRICI, P. et al. Therapeutic Approaches to Genetic Ion Channelopathies and Perspectives in Drug Discovery. **Front Pharmacol**, v. 7, p. 121, 2016.
- ISABEL, T. F. et al. Expression and partial biochemical characterization of a recombinant serine protease from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 115, p. 49-54, 2016.
- JANCARIK, J.; KIM, S. H. Sparse-Matrix Sampling - a Screening Method for Crystallization of Proteins. **Journal of Applied Crystallography**, v. 24, p. 409-411, 1991.
- JEHLE, J. et al. Novel roles for hERG K(+) channels in cell proliferation and apoptosis. **Cell Death Dis**, v. 2, p. e193, 2011.
- JENTSCH, T. J.; HUBNER, C. A.; FUHRMANN, J. C. Ion channels: function unravelled by dysfunction. **Nat Cell Biol**, v. 6, n. 11, p. 1039-47, 2004.
- JEVSEVAR, S.; KUNSTELJ, M.; POREKAR, V. G. PEGylation of therapeutic proteins. **Biotechnol J**, v. 5, n. 1, p. 113-28, 2010.
- JI, N. et al. Effect of Celastrol on Growth Inhibition of Prostate Cancer Cells through the Regulation of hERG Channel In Vitro. **Biomed Research International**, 2015.
- JIBSON, M. D.; BIRK, Y.; BEWLEY, T. A. Circular dichroism spectra of trypsin and chymotrypsin complexes with Bowman-Birk or chickpea trypsin inhibitor. **Int J Pept Protein Res**, v. 18, n. 1, p. 26-32, 1981.
- JIN, Y. et al. Purification and characterization of jerdofibrase, a serine protease from the venom of *Trimeresurus jerdonii* snake. **Toxicon**, v. 39, n. 8, p. 1203-10, 2001.
- JUNG, S. Y. et al. The Vroman effect: A molecular level description of fibrinogen displacement. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 42, p. 12782-12786, 2003.
- JUTURU, V.; WU, J. C. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. **Chembiochem**, v. 19, n. 1, p. 7-21, 2018.
- KALIA, J. et al. From Foe to Friend: Using Animal Toxins to Investigate Ion Channel Function. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 1, p. 158-175, 2015.

KARBALAEI, M.; REZAEI, S. A.; FARSIANI, H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **J Cell Physiol**, 2020.

KARNAOURI, A. et al. Recombinant expression of thermostable processive MtEG5 endoglucanase and its synergism with MtLPMO from *Myceliophthora thermophila* during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, 2017.

KASIMOVA, M. A.; GRANATA, D.; CARNEVALE, V. Voltage-Gated Sodium Channels: Evolutionary History and Distinctive Sequence Features. **Curr Top Membr**, v. 78, p. 261-86, 2016.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.

KHAN, S. et al. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. **Int J Genomics**, v. 2016, p. 2405954, 2016.

KIM, H. J. et al. A Novel Thrombolytic and Anticoagulant Serine Protease from Polychaeta, *Diopatra sugokai*. **J Microbiol Biotechnol**, v. 28, n. 2, p. 275-283, 2018.

KIM, J. B. Channelopathies. **Korean J Pediatr**, v. 57, n. 1, p. 1-18, 2014.

KIM, K. S.; KIM, E. J. The phenothiazine drugs inhibit hERG potassium channels. **Drug Chem Toxicol**, v. 28, n. 3, p. 303-13, 2005.

KIMPLE, M. E.; BRILL, A. L.; PASKER, R. L. Overview of affinity tags for protein purification. **Curr Protoc Protein Sci**, v. 73, p. 9 9 1-9 9 23, 2013.

KINI, R. M. Toxins in thrombosis and haemostasis: potential beyond imagination. **J Thromb Haemost**, v. 9 Suppl 1, p. 195-208, 2011.

KINSTLER, O. B. et al. Characterization and stability of N-terminally PEGylated rhG-CSF. **Pharm Res**, v. 13, n. 7, p. 996-1002, 1996.

KODERA, Y. et al. Pegylation of proteins and bioactive substances for medical and technical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 23, n. 7, p. 1233-1271, 1998.

KOMORI, Y.; NIKAI, T. Chemistry and biochemistry of kallikrein-like enzyme from snake venoms. **Journal of Toxicology-Toxin Reviews**, v. 17, n. 3, p. 261-277, 1998.

KOMORI, Y. et al. Effect of bilineobin, a thrombin-like proteinase from the venom of common cantil (*Agkistrodon bilineatus*). **Toxicon**, v. 31, n. 3, p. 257-70, 1993.

KOZLOV, S. Animal toxins for channelopathy treatment. **Neuropharmacology**, 2017.

KUANG, Q.; PURHONEN, P.; HEBERT, H. Structure of potassium channels. **Cell Mol Life Sci**, v. 72, n. 19, p. 3677-93, 2015.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-8, 1970.
- LALOR, F. et al. Sustainability in the biopharmaceutical industry: Seeking a holistic perspective. **Biotechnol Adv**, v. 37, n. 5, p. 698-707, 2019.
- LAWSON, R. et al. Phylogeny of the Colubroidea (Serpentes): new evidence from mitochondrial and nuclear genes. **Mol Phylogenet Evol**, v. 37, n. 2, p. 581-601, 2005.
- LEE, J. W. et al. Purification and characterization of brevinase, a heterogeneous two-chain fibrinolytic enzyme from the venom of Korean snake, *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 260, n. 3, p. 665-70, 1999.
- LEE, P. et al. PEGylation to Improve Protein Stability During Melt Processing. **Macromol Biosci**, v. 15, n. 10, p. 1332-7, 2015.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 6th. New York: W.H. Freeman, 2013. ISBN 9781429234146 (North American ed.) 1429234148 (North American ed.).
- LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 10, p. 790-802, 2003.
- LI, A. et al. Cloning, expression, purification and bioactivity evaluation of a thrombin-like enzyme from *Deinagkistrodon acutus* venom gland library. **Biotechnol Lett**, v. 40, n. 1, p. 93-102, 2018.
- LI, H. et al. Expression of recombinant tachyplesin I in *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, v. 157, p. 50-56, 2019.
- LI, Z. F. et al. [Recombinant batroxobin expressed highly in *Pichia pastoris*]. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 23, n. 3, p. 483-6, 2007.
- LIANG, M. H.; ZHOU, S. S.; JIANG, J. G. Construction, expression and characterization of a fusion protein HBscFv-IFN gamma in *Komagatella (Pichia) pastoris* X33. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 102, p. 74-81, 2017.
- LIM, B. B. et al. Molecular basis of fibrin clot elasticity. **Structure**, v. 16, n. 3, p. 449-59, 2008.
- LIN, W. C.; LICHT, S. Poly(Ethylene Glycol) as a Scaffold for High-Affinity Open-Channel Blockers of the Mouse Nicotinic Acetylcholine Receptor. **Plos One**, v. 9, n. 11, 2014.
- LIU, C.; LI, T.; CHEN, J. Role of High-Throughput Electrophysiology in Drug Discovery. **Curr Protoc Pharmacol**, v. 87, n. 1, p. e69, 2019.
- LIU, C. P. et al. Glycoengineering of antibody (Herceptin) through yeast expression and in vitro enzymatic glycosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 4, p. 720-725, 2018.

- LONG, S. B.; CAMPBELL, E. B.; MACKINNON, R. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. **Science**, v. 309, n. 5736, p. 903-8, 2005.
- LORBER, B. et al. Protein analysis by dynamic light scattering: methods and techniques for students. **Biochem Mol Biol Educ**, v. 40, n. 6, p. 372-82, 2012.
- LORD, S. T. Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis. **Curr Opin Hematol**, v. 14, n. 3, p. 236-41, 2007.
- LORINCZI, E. et al. Voltage-dependent gating of KCNH potassium channels lacking a covalent link between voltage-sensing and pore domains. **Nature Communications**, v. 6, 2015.
- LOUGHRAN, S. T.; WALLS, D. Purification of poly-histidine-tagged proteins. **Methods Mol Biol**, v. 681, p. 311-35, 2011.
- LOVE, K. R.; DALVIE, N. C.; LOVE, J. C. The yeast stands alone: the future of protein biologic production. **Curr Opin Biotechnol**, v. 53, p. 50-58, 2018.
- LUIZ, A. P.; WOOD, J. N. Sodium Channels in Pain and Cancer: New Therapeutic Opportunities. **Adv Pharmacol**, v. 75, p. 153-78, 2016.
- LUO, S. et al. Site specific PEGylation of beta-lactoglobulin at glutamine residues and its influence on conformation and antigenicity. **Food Res Int**, v. 123, p. 623-630, 2019.
- MACKESSY, S. P. **Handbook of venoms and toxins of reptiles**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2010. xvi, 521 p., 8 p. of plates ISBN 9780849391651 (alk. paper).
- MAIER, K. E.; RUSCONI, C. P.; LEVY, M. To PEGylate or Not To PEGylate Therapeutics? **Cell Chem Biol**, v. 26, n. 5, p. 615-616, 2019.
- MAJUMDAR, S. et al. Characterization, mechanism of anticoagulant action, and assessment of therapeutic potential of a fibrinolytic serine protease (Brevithrombolase) purified from *Brevibacillus brevis* strain FF02B. **Biochimie**, v. 103, p. 50-60, 2014.
- MARSHALL, D. et al. Polyethylene glycol modification of a galactosylated streptavidin clearing agent: effects on immunogenicity and clearance of a biotinylated anti-tumour antibody. **Br J Cancer**, v. 73, n. 5, p. 565-72, 1996.
- MATTOS, C.; RINGE, D. Proteins in organic solvents. **Curr Opin Struct Biol**, v. 11, n. 6, p. 761-4, 2001.
- MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **J Appl Crystallogr**, v. 40, n. Pt 4, p. 658-674, 2007.
- MCNAY, J. L.; O'CONNELL, J. P.; FERNANDEZ, E. J. Protein unfolding during reversed-phase chromatography: II. Role of salt type and ionic strength. **Biotechnol Bioeng**, v. 76, n. 3, p. 233-40, 2001.

- MCPHERSON, A. **Introduction to macromolecular crystallography**. 2nd. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell, 2009. x, 267 p. ISBN 9780470185902 (pbk.) 0470185902 (pbk.). Disponível em: < Table of contents only <http://www.loc.gov/catdir/toc/ecip0828/2008040417.html> >.
- MEJÍA-MANZANO, L. A.; VÁZQUEZ-VILLEGAS, P.; GONZÁLEZ-VALDEZ, J. J. A. I. P. T. Perspectives, Tendencies, and Guidelines in Affinity-Based Strategies for the Recovery and Purification of PEGylated Proteins. v. 2020, 2020.
- MENALDO, D. L. et al. Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteases from Bothrops pirajai snake venom. **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2545-58, 2012.
- MONFARDINI, C. et al. A branched monomethoxypoly(ethylene glycol) for protein modification. **Bioconjug Chem**, v. 6, n. 1, p. 62-9, 1995.
- MOREELS, L. et al. APETx4, a Novel Sea Anemone Toxin and a Modulator of the Cancer-Relevant Potassium Channel KV10.1. **Mar Drugs**, v. 15, n. 9, 2017.
- MORROW, J. F. et al. Replication and transcription of eukaryotic DNA in Escherichia coli. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 71, n. 5, p. 1743-7, 1974.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MOUHAT, S. et al. Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 24, p. 2503-18, 2008.
- MOVILEANU, L. et al. Detecting protein analytes that modulate transmembrane movement of a polymer chain within a single protein pore. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 10, p. 1091-1095, 2000.
- MUKHERJEE, A. K.; MACKESSY, S. P. Biochemical and pharmacological properties of a new thrombin-like serine protease (Russelobin) from the venom of Russell's Viper (*Daboia russelii russelii*) and assessment of its therapeutic potential. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3476-88, 2013.
- MULLARD, A. 2020 FDA drug approvals. **Nat Rev Drug Discov**, v. 20, n. 2, p. 85-90, 2021.
- MUNAWAR, A. et al. Snake Venom Peptides: Tools of Biodiscovery. **Toxins (Basel)**, v. 10, n. 11, 2018.
- MUNEKIYO, S. M.; MACKESSY, S. P. Effects of temperature and storage conditions on the electrophoretic, toxic and enzymatic stability of venom components. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 119, n. 1, p. 119-27, 1998.
- MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K. Thrombomodulin-independent activation of protein C and specificity of hemostatically active snake venom serine proteinases: crystal structures of native and inhibited Agkistrodon contortrix contortrix protein C activator. **J Biol Chem**, v. 280, n. 47, p. 39309-15, 2005.

- MURAYAMA, N. et al. The unusual high molecular mass of Bothrops protease A, a trypsin-like serine peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydrate content. **Biochim Biophys Acta**, v. 1652, n. 1, p. 1-6, 2003.
- MURPHY, R. W., J. FU, A. LATHROP, J.V. FELTHAM, V. KOVAC. *Biology of the Vipers*. 2002.
- NIELSEN, M.; LUNDEGAARD, C.; LUND, O. Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 238, 2007.
- NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nat Protoc**, v. 2, n. 9, p. 2212-21, 2007.
- NORTON, R. S.; CHANDY, K. G. Venom-derived peptide inhibitors of voltage-gated potassium channels. **Neuropharmacology**, v. 127, p. 124-138, 2017.
- OCHI, R.; CHETTIMADA, S.; GUPTE, S. A. Poly(Ethylene Glycol)-Cholesterol Inhibits L-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Currents and Augments Voltage-Dependent Inactivation in A7r5 Cells. **Plos One**, v. 9, n. 9, 2014.
- OLIVEIRA, I. S. et al. Global proteomic and functional analysis of *Crotalus durissus collilineatus* individual venom variation and its impact on envenoming. **J Proteomics**, v. 191, p. 153-165, 2019.
- OROSZLAN, P. et al. Conformational effects in the reversed-phase chromatographic behavior of recombinant human growth hormone (rhGH) and N-methionyl recombinant human growth hormone (Met-hGH). **Anal Chem**, v. 64, n. 14, p. 1623-31, 1992.
- OSHIMA-FRANCO Y, H. S., PRADO-FRANCESCHI J, CRUZ-HÖFLING MA, RODRIGUES-SIMIONI L. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin. **Toxicon**, v. 37, p. 16, 1998.
- OSHIMA-FRANCO, Y. et al. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin. **Toxicon**, v. 37, n. 10, p. 1341-57, 1999.
- OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Methods Enzymol**, v. 276, p. 307-26, 1997.
- OVERBEY, D. M.; JONES, E. L.; ROBINSON, T. N. How hemostatic agents interact with the coagulation cascade. **AORN J**, v. 100, n. 2, p. 148-59, 2014.
- OZTURK-ATAR, K.; EROGLU, H.; CALIS, S. Novel advances in targeted drug delivery. **J Drug Target**, v. 26, n. 8, p. 633-642, 2018.

PALM, T.; ESFANDIARY, R.; GANDHI, R. The effect of PEGylation on the stability of small therapeutic proteins. **Pharm Dev Technol**, v. 16, n. 5, p. 441-8, 2011.

PARRY, M. A. et al. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. **Structure**, v. 6, n. 9, p. 1195-206, 1998.

PARRY, M. A. A. et al. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. **Structure with Folding & Design**, v. 6, n. 9, p. 1195-1206, 1998.

PEIGNEUR, S. et al. Crotamine pharmacology revisited: novel insights based on the inhibition of KV channels. **Mol Pharmacol**, v. 82, n. 1, p. 90-6, 2012.

PEIGNEUR, S.; TYTGAT, J. Toxins in Drug Discovery and Pharmacology. **Toxins (Basel)**, v. 10, n. 3, 2018.

PIER, D. M. et al. Long-Term Channel Block Is Required to Inhibit Cellular Transformation by Human Ether-a-Go-Go-Related Gene (hERG1) Potassium Channels. **Molecular Pharmacology**, v. 86, n. 2, p. 211-221, 2014.

PINEDA, C. et al. Assessing the Immunogenicity of Biopharmaceuticals. **BioDrugs**, v. 30, n. 3, p. 195-206, 2016.

PISAL, D. S.; KOSLOSKI, M. P.; BALU-IYER, S. V. Delivery of Therapeutic Proteins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 6, p. 2557-2575, 2010.

POPP, M. W. et al. Sortase-catalyzed transformations that improve the properties of cytokines. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 8, p. 3169-74, 2011.

POTOCNAKOVA, L.; Bhide, M.; PULZOVA, L. B. An Introduction to B-Cell Epitope Mapping and In Silico Epitope Prediction. **Journal of Immunology Research**, 2016.

PRADHANANGA, S.; WILKINSON, I.; ROSS, R. J. Pegvisomant: structure and function. **J Mol Endocrinol**, v. 29, n. 1, p. 11-4, 2002.

PRADNIWAT, P.; ROJNUCKARIN, P. Snake venom thrombin-like enzymes. **Toxin Reviews**, v. 33(1-2), p. 16-22, 2014.

\_\_\_\_\_. The structure-function relationship of thrombin-like enzymes from the green pit viper (*Trimeresurus albolabris*). **Toxicon**, v. 100, p. 53-9, 2015.

PUXBAUM, V.; MATTANOVICH, D.; GASSER, B. Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, n. 7, p. 2925-38, 2015.

RIEDEL, T. et al. Fibrinopeptides A and B release in the process of surface fibrin formation. **Blood**, v. 117, n. 5, p. 1700-1706, 2011.

- ROBERTS, M. J.; BENTLEY, M. D.; HARRIS, J. M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54, n. 4, p. 459-76, 2002.
- RODRIGUES, V. M. et al. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from Bothrops neuwiedi snake venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 381, n. 2, p. 213-24, 2000.
- ROSTOVTSEVA, T. K.; NESTOROVICH, E. M.; BEZRUKOV, S. M. Partitioning of differently sized poly(ethylene glycol)s into OmpF porin. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 1, p. 160-169, 2002.
- ROY, J. et al. Pharmacological separation of hEAG and hERG K<sup>+</sup> channel function in the human mammary carcinoma cell line MCF-7. **Oncol Rep**, v. 19, n. 6, p. 1511-6, 2008.
- RUBINSTEIN, N. D. et al. Computational characterization of B-cell epitopes. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 12, p. 3477-3489, 2008.
- RUDY, B.; MCBAIN, C. J. Kv3 channels: voltage-gated K<sup>+</sup> channels designed for high-frequency repetitive firing. **Trends Neurosci**, v. 24, n. 9, p. 517-26, 2001.
- RYU, J. K.; KIM, H. S.; NAM, D. H. Current status and perspectives of biopharmaceutical drugs. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 5, p. 900-911, 2012.
- SAKAI, J. et al. Primary structure of a thrombin-like serine protease, kangshuanmei, from the venom of Agkistrodon halys brevicaudus stejneger. **Toxicon**, v. 48, n. 3, p. 313-22, 2006.
- SAMPAIO, S. C. et al. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1045-60, 2010.
- SANGUINETTI, M. C.; TRISTANI-FIROUZI, M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. **Nature**, v. 440, n. 7083, p. 463-9, 2006.
- SANT'ANA, C. D. et al. Molecular characterization of BjussuSP-I, a new thrombin-like enzyme with procoagulant and kallikrein-like activity isolated from Bothrops jararacussu snake venom. **Biochimie**, v. 90, n. 3, p. 500-507, 2008.
- SANTOS-FILHO, N. A. et al. Heterologous expression and biochemical and functional characterization of a recombinant alpha-type myotoxin inhibitor from Bothrops alternatus snake. **Biochimie**, v. 105, p. 119-28, 2014.
- SANTOS, J. H. P. M. et al. Protein PEGylation for the design of biobetters: from reaction to purification processes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, 2018.
- SANZ, L. et al. Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of Lachesis muta gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. **J Proteomics**, v. 71, n. 1, p. 46-60, 2008.
- SAUNA, Z. E. et al. Evaluating and Mitigating the Immunogenicity of Therapeutic Proteins. **Trends Biotechnol**, 2018.

SCHELLEKENS, H. Immunogenicity of therapeutic proteins clinical implications and future perspectives. **Clinical Therapeutics**, v. 24, n. 11, p. 20, 2002.

\_\_\_\_\_. Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins. **Nephrol Dial Transplant**, v. 20 Suppl 6, p. vi3-9, 2005.

SELIS, F. et al. Pegylated Trastuzumab Fragments Acquire an Increased in Vivo Stability but Show a Largely Reduced Affinity for the Target Antigen. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 4, p. 491, 2016.

SELISTRE, H. S.; GIGLIO, J. R. Isolation and Characterization of a Thrombin-Like Enzyme from the Venom of the Snake Bothrops-Insularis (Jararaca-Ilhoa). **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1135-1144, 1987.

SERRANO, S. M. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 19-26, 2013.

SERRANO, S. M.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115-32, 2005.

SERRANO, S. M. et al. Basic proteinases from Bothrops moojeni (caissaca) venom--I. Isolation and activity of two serine proteinases, MSP 1 and MSP 2, on synthetic substrates and on platelet aggregation. **Toxicon**, v. 31, n. 4, p. 471-81, 1993.

SERRANO, S. M. et al. A novel fibrinogen-clotting enzyme, TL-BJ, from the venom of the snake Bothrops jararaca: purification and characterization. **Thromb Haemost**, v. 83, n. 3, p. 438-44, 2000.

SHARMA, M. et al. PEGylation Enhances Mosquito-Larvicidal Activity of Lysinibacillus sphaericus Binary Toxin. **Bioconjug Chem**, v. 28, n. 2, p. 410-418, 2017.

SHARON, J. et al. Discovery of protective B-cell epitopes for development of antimicrobial vaccines and antibody therapeutics. **Immunology**, v. 142, n. 1, p. 1-23, 2014.

SHIEH, C. C. et al. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 4, p. 557-94, 2000.

SHIMIZU, T. et al. A hydroxyl PEG version of PEGylated liposomes and its impact on anti-PEG IgM induction and on the accelerated clearance of PEGylated liposomes. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 127, p. 142-149, 2018.

SILVA-JUNIOR, F. P. et al. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the Bothrops jararacussu venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility. **Toxicon**, v. 50, n. 1, p. 18-31, 2007.

SKERRETT, M. et al. Application of SCAM (substituted cysteine accessibility method) to gap junction intercellular channels. **Cell Commun Adhes**, v. 8, n. 4-6, p. 179-85, 2001.

- SOARES, C. M.; TEIXEIRA, V. H.; BAPTISTA, A. M. Protein structure and dynamics in nonaqueous solvents: insights from molecular dynamics simulation studies. **Biophys J**, v. 84, n. 3, p. 1628-41, 2003.
- SOARES, S. G.; OLIVEIRA, L. L. Venom-sweet-venom: N-linked glycosylation in snake venom toxins. **Protein Pept Lett**, v. 16, n. 8, p. 913-9, 2009.
- SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Anal Biochem**, v. 287, n. 2, p. 252-60, 2000.
- STAVROS, F. et al. Characterization of structure and function of ZS-9, a K<sup>+</sup> selective ion trap. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114686, 2014.
- STEVENS, M.; PEIGNEUR, S.; TYTGAT, J. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. **Frontiers in Pharmacology**, v. 2, 2011.
- STRYJEWSKA, A. et al. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. **Pharmacol Rep**, v. 65, n. 5, p. 1075-85, 2013.
- SZLACHCIC, A.; ZAKRZEWSKA, M.; OTLEWSKI, J. Longer action means better drug: Tuning up protein therapeutics. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 4, p. 436-441, 2011.
- TANNER, M. R. et al. Prolonged immunomodulation in inflammatory arthritis using the selective Kv1.3 channel blocker HsTX1[R14A] and its PEGylated analog. **Clin Immunol**, v. 180, p. 45-57, 2017.
- TAVARES, N. U. et al. Factors associated with low adherence to medicine treatment for chronic diseases in Brazil. **Rev Saude Publica**, v. 50, n. suppl 2, p. 10s, 2016.
- TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 60, n. 5, p. 523-33, 2003.
- THAKOR, P. et al. Polymer-drug conjugates: recent advances and future perspectives. **Drug Discov Today**, v. 25, n. 9, p. 1718-1726, 2020.
- THI NGUYEN, N. T. et al. Shielding effect of a PEG molecule of a mono-PEGylated peptide varies with PEG chain length. **Prep Biochem Biotechnol**, p. 1-6, 2018.
- TIAN, C. et al. Potassium channels: structures, diseases, and modulators. **Chem Biol Drug Des**, v. 83, n. 1, p. 1-26, 2014.
- TURECEK, P. L. et al. PEGylation of Biopharmaceuticals: A Review of Chemistry and Nonclinical Safety Information of Approved Drugs. **J Pharm Sci**, v. 105, n. 2, p. 460-75, 2016.
- UETZ, P.; HOŠEK, J.; HALLERMANN, J. **The reptile database** 2016.

ULLAH, A. et al. Crystal structure of Jararacussin-I: the highly negatively charged catalytic interface contributes to macromolecular selectivity in snake venom thrombin-like enzymes. **Protein Sci**, v. 22, n. 1, p. 128-32, 2013.

VALERIANO-ZAPANA, J. A. et al. Functional and structural characterization of a new serine protease with thrombin-like activity TLBan from *Bothrops andianus* (Andean Lancehead) snake venom. **Toxicon**, v. 59, n. 2, p. 231-240, 2012.

VANDERLAAN, M. et al. Changes in Manufacturing Processes of Biologic Therapies Can Alter the Immunogenicity Profile of the Product. **Clin Pharmacol Ther**, v. 107, n. 4, p. 988-993, 2020.

VERONESE, F. M.; MERO, A. The impact of PEGylation on biological therapies. **BioDrugs**, v. 22, n. 5, p. 315-29, 2008.

VIJAY, N. et al. Expression of bovine interleukin 15 in *Pichia pastoris* and study on its biological activity: a T-cell activator. **Anim Biotechnol**, v. 31, n. 4, p. 357-364, 2020.

VILCA-QUISPE, A. et al. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 745-753, 2010.

VILLEGAS, M. R.; BAEZA, A.; VALLET-REGI, M. Nanotechnological Strategies for Protein Delivery. **Molecules**, v. 23, n. 5, 2018.

VIVAS-RUIZ, D. E. et al. Coagulant thrombin-like enzyme (barnettobin) from *Bothrops barnetti* venom: molecular sequence analysis of its cDNA and biochemical properties. **Biochimie**, v. 95, n. 7, p. 1476-86, 2013.

WALLACE, J. L.; GOW, I. F.; WARNOCK, M. The life and death of breast cancer cells: proposing a role for the effects of phytoestrogens on potassium channels. **J Membr Biol**, v. 242, n. 2, p. 53-67, 2011.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 9, p. 917-24, 2010a.

\_\_\_\_\_. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. **Drug Discov Today**, v. 15, n. 17-18, p. 773-80, 2010b.

\_\_\_\_\_. Biopharmaceutical benchmarks 2014. **Nat Biotechnol**, v. 32, n. 10, p. 992-1000, 2014.

WAN, X. et al. Effect of protein immunogenicity and PEG size and branching on the anti-PEG immune response to PEGylated proteins. **Process Biochemistry**, v. 52, p. 183-191, 2017.

WAN, X. et al. Effect of protein immunogenicity and PEG size and branching on the anti-PEG immune response to PEGylated proteins. **Process Biochemistry**, v. 52, p. 183-191, 2017.

WANG, W.; MACKINNON, R. Cryo-EM Structure of the Open Human Ether-a-go-go-Related K(+) Channel hERG. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 422-430 e10, 2017.

WATANABE, E. et al. Na(v)2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 20, p. 7743-7751, 2000.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Res**, v. 46, n. W1, p. W296-W303, 2018.

WHICHER, J. R.; MACKINNON, R. Structure of the voltage-gated K(+) channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism. **Science**, v. 353, n. 6300, p. 664-9, 2016.

WHITLEY, R. D.; ZHANG, X.; WANG, N. H. L. Protein denaturation in nonlinear isocratic and gradient elution chromatography. v. 40, n. 6, p. 1067-1081, 1994.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392-400, 2008.

WILKINS, M. R. et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. **Methods Mol Biol**, v. 112, p. 531-52, 1999.

WOHLRAB, J. [Basics of the pharmacology of biopharmaceuticals]. **Hautarzt**, v. 70, n. 12, p. 926-933, 2019.

WOLBINK, G. J.; AARDEN, L. A.; DIJKMANS, B. A. Dealing with immunogenicity of biologicals: assessment and clinical relevance. **Curr Opin Rheumatol**, v. 21, n. 3, p. 211-5, 2009.

WU, L. et al. Precise and combinatorial PEGylation generates a low-immunogenic and stable form of human growth hormone. **J Control Release**, v. 249, p. 84-93, 2017.

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

WULFF, H. et al. Antibodies and venom peptides: new modalities for ion channels. **Nat Rev Drug Discov**, v. 18, n. 5, p. 339-357, 2019.

WYNN, T. T.; GUMUSCU, B. Potential role of a new PEGylated recombinant factor VIII for hemophilia A. **J Blood Med**, v. 7, p. 121-8, 2016.

XU, Y. et al. Structure-based antigenic epitope and PEGylation improve the efficacy of staphylokinase. **Microb Cell Fact**, v. 16, n. 1, p. 197, 2017.

XUE, X. et al. Phenyl linker-induced dense PEG conformation improves the efficacy of C-terminally monoPEGylated staphylokinase. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 2, p. 331-341, 2013.

YANG, D. P. et al. Expression, purification and characterization of Gloydus shedaoensis venom glosedobin as Hsp70 fusion protein in Pichia pastoris. **Protein Expression and Purification**, v. 66, n. 2, p. 138-142, 2009.

- YANG, L.; DORDICK, J. S.; GARDE, S. Hydration of enzyme in nonaqueous media is consistent with solvent dependence of its activity. **Biophys J**, v. 87, n. 2, p. 812-21, 2004.
- YELLEN, G. The moving parts of voltage-gated ion channels. **Q Rev Biophys**, v. 31, n. 3, p. 239-95, 1998.
- YONAMINE, C. M. et al. Kinetic characterization of gyroxin, a serine protease from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2791-3, 2012.
- YONAMINE, C. M. et al. Cloning of serine protease cDNAs from *Crotalus durissus terrificus* venom gland and expression of a functional Gyroxin homologue in COS-7 cells. **Toxicon**, v. 54, n. 2, p. 110-20, 2009.
- YOU, W. K. et al. Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. **FEBS Lett**, v. 571, n. 1-3, p. 67-73, 2004.
- YUAN, S. et al. [Expression of snake venom thrombin-like enzyme calobin in *Pichia pastoris*]. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 25, n. 4, p. 526-32, 2009.
- ZAKLYAZMINSKAYA, E.; DZEMESHKEVICH, S. The role of mutations in the SCN5A gene in cardiomyopathies. **Biochim Biophys Acta**, v. 1863, n. 7 Pt B, p. 1799-805, 2016.
- ZAQUEO, K. D. et al. Isolation and biochemical characterization of a new thrombin-like serine protease from *Bothrops pirajai* snake venom. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 595186, 2014.
- ZELANIS, A. et al. Snake venom serine proteinases specificity mapping by proteomic identification of cleavage sites. **J Proteomics**, v. 113, p. 260-7, 2015.
- ZHAN, C. et al. Toxins and derivatives in molecular pharmaceuticals: Drug delivery and targeted therapy. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 90, p. 101-18, 2015.
- ZHANG, L. et al. The strategies and techniques of drug discovery from natural products. **Pharmacol Ther**, p. 107686, 2020.
- ZHANG, S. T. et al. Co-overexpression of PpPDI enhances secretion of ancrod in *Pichia pastoris*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 164, n. 7, p. 1037-47, 2011.
- ZHANG, Y. et al. Bioactivity and circulation time of PEGylated NELL-1 in mice and the potential for osteoporosis therapy. **Biomaterials**, v. 35, n. 24, p. 6614-21, 2014.
- ZHANG, Y. et al. A novel plasminogen activator from snake venom. Purification, characterization, and molecular cloning. **J Biol Chem**, v. 270, n. 17, p. 10246-55, 1995.
- ZHAO, X.; LI, G.; LIANG, S. Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. **J Anal Methods Chem**, v. 2013, p. 581093, 2013.
- ZHU, Z. et al. Crystal structures and amidolytic activities of two glycosylated snake venom serine proteinases. **J Biol Chem**, v. 280, n. 11, p. 10524-9, 2005.



## ANEXOS

**ANEXO A.** Certificado de regularidade do serpentário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) para utilização de diferentes venenos animais, emitido pelo IBAMA.

 	
Ministério do Meio Ambiente Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis <b>CADASTRO TÉCNICO FEDERAL</b> <b>CONSULTA PÚBLICA A CERTIFICADO DE REGULARIDADE - CR</b>	
Registro n.º:	1506748
Data da consulta:	19/02/2020
CR emitido em:	10/12/2019
CR válido até:	10/03/2020
<a href="#">Dados básicos</a>	
CNPJ:	63.025.530/0026-62
Razão social:	FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP
Nome fantasia:	FMRP - CRIADOURO CIENTÍFICO DA USP
Data de abertura:	21/05/1952
<a href="#">Endereço</a>	
Logradouro:	AV. BANDEIRANTES 3900
Complemento:	CAMPUS DA USP
N.º:	3900
Município:	RIBEIRAO PRETO
Bairro:	MONTE ALEGRE
UF:	SP
CEP:	14049-900
<b>Cadastro Técnico Federal de Atividades Potencialmente Poluidoras e Utilizadoras de Recursos Ambientais – CTF/APP</b>	
<a href="#">Categoria</a>	<a href="#">Detalhe</a>
21 - Atividades não relacionadas no Anexo VIII da Lei nº 6.938/1981	55 - Criação científica de fauna silvestre para fins de pesquisa - Instrução Normativa IBAMA Nº 7/2015; art. 3º. VI
<p>Conforme dados disponíveis na presente data, a pessoa jurídica acima possui Certificado de Regularidade em conformidade com as obrigações cadastrais e de prestação de informações ambientais sobre as atividades desenvolvidas sob controle e fiscalização do Ibama, por meio do CTF/APP.</p> <p>O certificado de regularidade emitido pelo CTF/APP não desobriga a pessoa inscrita de obter licenças, autorizações, permissões, concessões, alvarás e demais documentos exigíveis por instituições federais, estaduais, distritais ou municipais para o exercício de suas atividades.</p> <p>O Certificado de Regularidade do CTF/APP não habilita o transporte e produtos e subprodutos florestais e faunísticos.</p>	
<a href="#">Fechar</a>	

**ANEXO B.** Comprovante de cadastro de acesso ao patrimônio genético, no Sistema Nacional de Gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado.



**Ministério do Meio Ambiente**  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
**Cadastro nº A64944C**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A64944C**  
Usuário: **Universidade de São Paulo**  
CPF/CNPJ: **63.025.530/0001-04**  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
Finalidade do Acesso:  
 **Pesquisa Científica**       **Bioprospecção**       **Desenvolvimento Tecnológico**

**Espécie**

**Crotalus d. terrificus**  
**Bothrops pauloensis**  
**Crotalus d. collilineatus**  
**Bothrops alternatus**  
**Bothrops atrox**  
**Bothrops jararaca**  
**Bothrops jararacussu**  
**Bothrops mojeni**  
**Lachesis muta**

Título da Atividade: **TOXINAS ANIMAIS NATIVAS E RECOMBINANTES: ANÁLISE FUNCIONAL, ESTRUTURAL E MOLECULAR**

**Equipe**

Suely Vilela	Reitoria da Universidade de São Paulo
Antonio Cardozo dos Santos	FCFRP-USP
Eliane Candiani Arantes Braga	FCFRP-usp
Fabiola Attié de Castro	FCFRP-USP
Maria Cristina Nonato	FCFRP-USP
Benedito Barravieira	CEVAP UNESP Botucatu
Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva	FCFRP-USP
Catarina de Fatima Pereira Teixeira	Instituto Butantã
Fabiani Gai Frantz	FCFRP-USP
Hamilton Cabral	FCFRP-USP
Jose Cesar Rosa	FMRP-USP
Luciana Simon Pereira Crott	FCFRP-USP
Lucilene Delazari dos Santos	CEVAP UNESP Botucatu
Lusânia Maria Gregg Antunes	FCFRP-USP
Lucia Helena Faccioli	FCFRP-USP
Maria Regina Torqueti	FCFRP-USP
Rui Seabra Ferreira Junior	CEVAP UNESP Botucatu
Sergio Akira Uyemura	FCFRP-USP
Danilo Luccas Menaldo	FCFRP-USP
Anna Laura Bechara Jacob Ferreira	FCFRP-USP
Ricardo Augusto Pereira de Pádua	FCFRP-USP
Gabriela Toninato de Paula	FVFRP-USP
Gisele Adriano Wiezel	FCFRP-USP
Johara Boldrini França	FCFRP-USP
Thais Fontanezi Maciel	FCFRP-USP
Martin Krahenbuhl Amstalden	FCFRP-USP
Tassia Rafaella Costa	FCFRP-USP
Marco Aurélio Sartin	FCFRP-USP
Joane Kathelen Rustiguel Bonalumi	FCFRP-USP
Carolina Petri Bernardes	FCFRP-USP
Sandra Mara Burin de Menezes	FCFRP-USP

<b>Fernanda Gobbi Amarin</b>	<b>FCFRP-USP</b>
<b>Murilo Racy Soares</b>	<b>FCFRP-USP</b>
<b>Gabriel Neves Cezarette</b>	<b>FCFRP-USP</b>
<b>Elbio Leiguez Junior</b>	<b>Instituto Butantã</b>
<b>Barbara Marques Coutinho</b>	<b>FCFRP-USP</b>
<b>Rafaella Varzoni Manzini</b>	<b>FCFRP-USP</b>
<b>Marilia Moraes Simon</b>	<b>FCFRP-USP</b>
<b>Ernesto Lopes Pinheiro Junior</b>	<b>FCFRP-USP</b>
<b>Isadora Sousa de Oliveira</b>	<b>FCFRP-USP</b>

Data do Cadastro: **25/10/2018 16:08:37**  
Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **16:11** de **25/10/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**

**ANEXO C.** Aprovação do Laboratório de Toxinas Animais, pela Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), para trabalhar com organismos geneticamente modificados (OGMs) de classe de risco 1 (Nível de biossegurança NB-1).



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto  
COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA



Of. CIBio/FCFRP 010/2018  
dfav

Ribeirão Preto, 30 de outubro de 2018.

A Senhora  
**Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga**  
Departamento de Física e Química  
FCFRP-USP

Assunto: **INCLUSÃO DE LABORATÓRIO DE PESQUISA NO CQB/FCFRP**

Prezada Professora,

A Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) aprovou em sua 47ª Reunião Ordinária, realizada em 15/08/2018, a inclusão do laboratório de pesquisa intitulado "**Laboratório de Toxinas Animais**", sob responsabilidade de Vossa Senhoria, para utilização do Certificado de Qualidade em Biossegurança da FCFRP-USP (CQB 0019/97).

O laboratório tem permissão para trabalhar apenas com Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) da **Classe de Risco 1 – Nível de Biossegurança NB-1**.

Informamos também que a Comissão Interna de Biossegurança tem permissão legal para visitar o laboratório, a qualquer tempo ou momento, para avaliação das condições físicas, técnicas, de infraestrutura e de pessoal, com vistas à concessão, manutenção ou revogação do CQB.

Atenciosamente,

PROF. DR. HAMILTON CABRAL  
PRESIDENTE DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA  
FCFRP/USP

**ANEXO D.** Certificado de aprovação emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**  
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização estrutural, funcional e análise da resposta imune in vivo de um serinoprotease recombinante de *Crotalus durissus collilineatus* modificada por PEGlação", registrada sob nº 17.1.64.60.0, sob a responsabilidade de Ernesto Lopes Pinheiro Júnior e Eliane Candiani Arantes, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP) na reunião do dia 30/03/2017.

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	jun/2017 a jun/19
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo isogênico BALB/c
Nº de animais	50
Peso/Idade	19-25g/ -
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP RP

Ribeirão Preto, 03 de abril de 2017.

  
 Ana Patrícia Yatsuda Natsui  
 Coordenadora da CEUA-FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre - CEP 14040-903 - Ribeirão Preto - SP  
 Comissão de Ética no Uso de Animais - ceua@fcfrp.usp.br  
 Fone: (16) 3315-8559 - Fax: (16) 33152-4892

*Ernesto Lopes Pinheiro Júnior*