UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Expressão heteróloga e caracterização de duas toxinas do escorpião *Tityus serrulatus*

Francielle Almeida Cordeiro

Ribeirão Preto 2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Expressão heteróloga e caracterização de duas toxinas do escorpião *Tityus serrulatus*

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

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado(a): Francielle Almeida Cordeiro

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

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

Ribeirão Preto 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Cordeiro, Francielle Almeida

Expressão heteróloga e caracterização de duas toxinas do escorpião *Tityus serrulatus*. Ribeirão Preto, 2017

112p. : il., 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia Orientadora: **Braga, Eliane Candiani Arantes**

1. Pichia pastoris. 2. Tityus serrulatus. 3. Ts8. 4. scorpine-like

FOLHA DE APROVAÇÃO

Francielle Almeida Cordeiro

Expressão heteróloga e caracterização de duas toxinas do escorpião Tityus serrulatus

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga

Aprovado em:

Banca Examinadora	
Prof. Dr.:	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr.:	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr.:	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr.:	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr.:	
Instituição:	Assinatura:

Dedico este trabalho aos meus pais que foram e são meus eternos mestres da vida!

AGRADECIMENTOS

A Deus por me inspirar, por me dar forças nos momentos que pensei em desistir, por me permitir adquirir tanto conhecimento e me dar saúde.

Aos meus pais por serem tão especiais. Meu pai partiu logo no início deste trabalho, mas continuou presente e com certeza seria o mais orgulhoso de me ver virar Doutora. Minha mãe, por ser da área acadêmica, foi a que mais compreendeu os momentos de dificuldade e me deu muitos conselhos para permanecer firme. Hoje devo tudo que sou a eles, aos seus ensinamentos, mas também por serem um exemplo vivo de honestidade, de amor, de família!

A toda a minha família! Pelas orações, por tanto amor, por tanto carinho. Um agradecimento especial a minha queria tia Flaveli, que também partiu durante o meu doutorado e que era uma excelente Doutora em Química! Tia obrigada por tudo! Saudades.

Ao meu noivo e em breve marido, por ter compreendido mesmo sendo de outra área, os meus momentos de ausência, de finais de semana no laboratório, de cansaço. De ter me apoiado quando fui pra Bélgica realizar parte deste trabalho. De me estimular a querer sempre mais e abrir meus horizontes. Em breve seremos um só e juntos vamos mais longe! Te amo!

A todos os meus amigos queridos, meu clã, amigos de Londrina e Ribeirão! Vocês que estão sempre torcendo, vibrando e comemorando as minhas conquistas e me ajudando nos períodos difíceis.

A minha querida orientadora Eliane! Obrigada por ser mais que uma orientadora para nós. Obrigada por ser uma mãe, por se preocupar, por ser tão presente! Obrigada por ser tão especial e por fazer do nosso dia a dia um ambiente maravilhoso de aprendizado e de amizade!

A Johara e Fernanda por terem me ensinado toda a parte de Biologia Molecular. Por terem tido paciência e por serem tão competentes no que fazem, e além de tudo ainda serem minhas irmãs de alma! Para a vida toda!!

Um agradecimento especial ao Ernesto e a Iara por terem me ajudado tanto! Jamais esquecerei do tanto que me ajudaram na finalização deste trabalho! Er obrigada também por compartilhar comigo os conselhos e amizade.

Agradeço também à Karlinha pelo auxílio sempre e a todos os amigos do LTA! Obrigada pelo ambiente de trabalho maravilhoso!

Um agradecimento especial ao Professor Jan Tytgat pelo suporte na minha ida à Bélgica. Sem o seu auxílio, parte deste trabalho não seria possível. Obrigada a todos os colegas do laboratório de Toxicologia e Farmacologia da KU-Leuven.

Agradeço a Jacqueline do Centro de Espectrometria de Massas e a Dra. Karina Zoccal pelo auxílio nas análises.

Obrigada a todos os funcionários da FCFRP. Rosana Florêncio, Rosemary Ioshimine, Henrique Theodoro e à secretária do departamento, Maria Aparecida Segato, obrigada por tudo!

Às agências de fomento CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro de bolsas e à FAPESP pelo auxílio regular.

Desde já agradeço os avaliadores deste trabalho pela contribuição!

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho, minha eterna gratidão!

"A persístência é o menor camínho do êxíto". (Charles Chaplín)

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

CORDEIRO, F. A. Heterologous expression and characterization of two toxins from *Tityus serrulatus* scorpion venom. 2017. 112f. Thesis (PhD). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Scorpions are among the oldest venomous animals on Earth, existing for over 400 million years. The venoms of these animals contain a complex mixture of proteins and peptides that can interact with high complexity with their victims. In Brazil, the main genus of scorpions responsible for accidents is Tityus genus, in which the species T. serrulatus, T. bahiensis, T. obscurus and T. stigmurus are inserted. T. serrulatus venom (Tsv) is composed mostly of peptides with action on sodium and potassium channels, but also have enzymes such as hyaluronidases, proteases and other compounds such as hypotensins, antimicrobial peptides (AMPs) and bradykinin potentiating peptides. Many of the components found in scorpion venoms have been studied for their important pharmacological activities, such as analgesic, antimicrobial, antitumor and anti-inflammatory properties. However, it is known that there is great difficulty in obtaining these substances because of the low yield of the isolated components from the venom. With this, the heterologous expression of proteins has been used to enable the production of toxins in sufficient amount for biotechnological purpose. In this panorama, the aim of this study is the expression of two peptides present in the venom of Tityus serrulatus, as well as their comparison with the native peptides in relation to their structure and functional activity. The toxins chosen were Ts8 and Ts8-propeptide, also called scorpine-like, acting on potassium channels (KTxs). Sequences and cDNAs templates of the expressed toxins were obtained from the cDNA library of the Titvus serrulatus gland constructed in our laboratory. Synthetic genes containing the toxins of interest were transformed into Pichia pastoris cells of strain KM71H. Expression of the recombinant Ts8 and Ts8-propeptide revealed the presence of the toxins, but they underwent proteolytic degradation by P. pastoris enzymes. Thus, we evaluate the expression in the presence of substrate as the casamino acids, as well as in the decrease of pH, temperature and addition of protease inhibitors. In addition, rTs8, although cleaved, could be obtained with potassium channel activity. New purification steps in ion exchange and reverse phase columns were standardized to obtain the native toxins from the venom of T. serrulatus. In addition, it was possible to identify the presence of native Ts8 and Ts8-propeptide (scorpine-like) by mass spectrometry in one of the fractions obtained from the venom chromatography. The addition of casamino acids was favourable for toxin expression, but was not sufficient to minimize proteolytic degradation. Functional assays with recombinant toxin fragments and native toxins have demonstrated the release of cytokines such as TNF- α and IL-1 β in some of the toxins tested. In addition, the toxins were shown to inhibit the growth of Pichia pastoris in the antifungal test and were not toxic to alveolar macrophages cells at the concentrations tested. Thus, this work contributed to demonstrate the activity of proteolytic enzymes in *P.pastoris* expression, to evaluate the conditions under which they are released, as well as to demonstrate the activity of rTs8 in the electrophysiological assay and the antifungal activity of recombinant and native toxins.

Keywords: Pichia pastoris, Tityus serrulatus, Ts8, scorpine-like.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Epidemiologia dos acidentes.	3
Figura 2. Tityus serrulatus ou escorpião amarelo.	5
Figura 3. Representação do canal para sódio dependente de voltagem.	8
Figura 4. Canais para potássio e suas famílias.	11
Figura 5. Representação da subunidade α do canal para potássio.	11
Figura 6. Fluxograma representativo das principais etapas realizadas no presente	25
trabalho.	
Figura 7. Protocolo de pulso de voltagem usado para canais dos tipos Kv1.1,	36
K _V 1.3 e ShakerIR.	
Figura 8. Representação esquemática do desenho dos genes sintéticos.	42
Figura 9. Representação esquemática das sequências das proteínas	43
recombinantes traduzidas.	
Figura 10. Vetor de clonagem/expressão pPICZα.	44
Figura 11. Perfil eletroforético em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR de	
colônia das células de Pichia pastoris KM71H transformadas com o plasmídeo	45
recombinante contendo o gene da Ts8.	
Figura 12. Perfil eletroforético em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR de	
colônia das células de Pichia pastoris KM71H transformadas com o plasmídeo	46
recombinante contendo o gene da Ts8-propeptídeo.	
Figura 13. Perfil representativo da SDS-PAGE da triagem das colônias para	48
expressão da rTs8 em placa de 26 poços.	
Figura 14. Perfil representativo da SDS-PAGE da triagem das colônias para	49
expressão da rTs8-propeptídeo em placa de 26 poços.	
Figura 15. Perfil representativo da SDS-PAGE do sobrenadante da cultura em	50
maior escala da colônia 10 que expressa a rTs8.	
Figure 16. Perfil representativo da SDS-PAGE das frações da cromatografia em	51
coluna IMAC da rTs8.	
Figura 17. Espectros de massas obtidos para a fração eluída com 250 mM de	52
imidazol (100%B).	
Figura 18. Perfil representativo da SDS-PAGE das frações de cromatografia em	55
coluna IMAC da rTs8 expressa com adição de PMSF.	

Figura 19. Perfil representativo da cromatografia em fase reversa das frações	56
G4a a G6c pós <i>desalting</i> .	
Figura 20. Perfil representativo da SDS-PAGE das frações obtidas da	57
cromatografia em fase reversa das frações G4a a G6c.	
Figura 21. Perfil representativo da cromatografia em fase reversa do produto da	58
clivagem da região de poli-histidina da fração 8.	
Figura 22. Espectro de massas obtido da fração 5 da cromatografia de fase	59
reversa demonstrado no perfil da figura 21.	
Figura 23. Perfil representativo da SDS-PAGE da expressão em maior escala da	60
colônia 9 da rTs8-propeptideo.	
Figura 24. Perfil representativo da SDS-PAGE das frações da cromatografia em	61
coluna IMAC da rTs8-propeptideo expressa em meio BMMY.	
Figura 25. Perfis representativos de SDS-PAGEs para avaliação da expressão da	65
rTs8 com adição de casaminoácidos.	
Figura 26. Perfis representativos de SDS-PAGEs para avaliação da expressão da	64
Ts8-propeptideo com adição de casaminoácidos.	
Figura 27. Perfis representativos de SDS PAGEs da avaliação da expressão da	67
Ts8 e Ts8- propeptídeo com inibidores de proteases	
Figura 28. Perfis representativos de SDS PAGEs da avaliação da expressão da	69
Ts8 e Ts8-propeptídeo com diminuição da temperatura para 20°C.	
Figura 29. Perfis representativos das SDS-PAGEs das frações da cromatografia	71
em coluna IMAC da rTs8 expressa com adição de casaminoácidos.	
Figura 30. Perfil representativo da cromatografia em fase reversa das frações	72
G3a a G6c pós <i>desalting</i> .	
Figura 31. Espectros de massas dos picos 2, 3 e 4 em MALDI-TOF modo linear	74
positivo.	
Figura 32. Espectros de massas dos picos 5, 6 e 7 em MALDI-TOF modo linear	75
positivo.	
Figura 33. Espectros de massas dos picos 8 e 9 em MALDI-TOF modo linear	76
positivo.	

Figura 34. Perfil representativo da SDS-PAGE das frações da cromatografia em	78
coluna IMAC da rTs8-propeptideo expressa com adição de casaminoácidos ao	
meio.	
Figura 35. Perfil representativo da cromatografia em fase reversa das frações	79
G1a a G3a pós <i>desalting</i> .	
Figura 36. Espectro de massas do pico 3 do perfil da figura 33 em MALDI-TOF	79
modo linear positivo.	
Figura 37. Perfil representativo da cromatografia de 50 mg da peçonha de <i>Tityus</i>	81
serrulatus em CM-celulose-52.	
Figura 38. Perfil representativo da cromatografia em fase reversa da fração	82
VIIIB (450 µg) obtida da CM-celulose-52.	
Figura 39. Espectros de massas em MALDI-TOF das frações 15 e 16 da figura	83
38.	
Figura 40. Estudo eletrofisiológico da rTs8 nos canais para potássio dependentes	84
de voltagem do tipo Kv1.1, Kv 1.3 e Shaker.	
Figura 41. Ensaio de citotoxicidade da peçonha (Tsv) e toxinas nativas (Ts8 e	87
Ts8+Ts8-prop.) e recombinantes (rTs8 pico4, rTs8 pico8 e rTs8-prop. pico3) em	
célula de macrófagos alveolares.	
Figura 42. Análise da liberação da citocina TNF- α na presença da peçonha	
(Tsv), das toxinas nativas (Ts8 e Ts8+Ts8-prop.) e recombinantes (rTs8 pico4,	88
rTs8 pico8 e rTs8-prop. pico3).	
Figura 43. Análise da liberação da citocina IL-1β na presença da peçonha bruta	89
(Tsv), das toxinas nativas (Ts8 e Ts8+Ts8-prop.) e recombinantes (rTs8 pico4,	
rTs8 pico8 e rTs8-prop. pico3).	
Figura 44. Liberação de nitrito na presença da peçonha (Tsv), das toxinas	90
nativas (Ts8 e Ts8+Ts8-prop.) e recombinantes (rTs8 pico4, rTs8 pico8 e rTs8-	

prop. pico3).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de recuperação da cromatografía em fase reversa das	56
frações G4a a G6c pós <i>desalting</i>	
Tabela 2. Porcentagem de recuperação da cromatografia em fase reversa das	72
frações G3b a G6c pós desalting da expressão com casaminoácidos	
Tabela 3. Medidas dos diâmetros dos halos (mm) de inibição do crescimento da	91
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	
Tabela 4. Medidas dos diâmetros dos halos (mm) de inibição do crescimento da	92
Pichia pastoris (KM71H)	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

®: Marca registrada **ACN:** acetonitrila arg4: argininosuccinato liase BCRJ: Banco de Células do Rio de Janeiro **BMGY:** Buffered complex medium containing glycerol **BMMY:** Buffered complex medium containing methanol cDNA: DNA complementar **CID:** Collision-induced dissociation **Da:** Dalton DHB: 2,5-ácido dihidroxidobenzoico **DMSO:** dimetilsulfóxido **DTT:** ditiotreitol **EPM:** erro padrão médio EROS: Espécies reativas de oxigênio EUA: Estados Unidos da América **FPLC:** Fast Protein Liquid Chromatography **IBAMA:** Instituto Brasileiro do Meio Ambiente **IL-1β:** interleucina 1 beta **IMAC**: Immobilized-Metal Affinity Chromatography **kDa:** Kilodaltons Kv: canais para potássio dependentes de voltagem m/z: razão massa/carga MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization mRNA: RNA mensageiro MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazolium Mut^s: *metanol utilization slow* Nav: canais para sódio dependentes de voltagem ^oC: Graus centígrados ON: óxido nítrico **PAGE:** eletroforese em gel de poliacrilamida **PAM:** peptídeos antimicrobianos pb: pares de bases

pH: potencial hidrogeniônico

PM: padrão massa molecular

rpm: rotações por minuto

SDS: dodecil sulfato de sódio

TNF-*α***:** fator de necrose tumoral

Tsv: Tityus serrulatus venom

TFA: ácido trifluoroacético

UFC: unidade formadora de colônia

UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography

YNB: Yeast nitrogen base without amino acids

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

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

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

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

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Toxinas de escorpião e canais para sódio	7
1.2. Toxinas de escorpião e canais para potássio	9
1.3. Toxinas de escorpião com atividade antimicrobiana	14
1.4. Ts8 e Ts8-propeptídeo	16
1.5. Clonagem e expressão de toxinas	17
2. OBJETIVOS	
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DAS TOXINAS RECOMBINANTES	
3.1.1. Desenho dos genes sintéticos	
3.1.2. Transformação dos genes sintéticos em Pichia pastoris	
3.1.3. Seleção em meio BMMY da melhor colônia para expressão em escala prep	oarativa
3.1.4. Expressão em escala preparativa em meio BMMY	
3.1.5. Expressão em escala preparativa da r1s8 com adição de PMSF	
3.1.6. Avaliação da expressão na presença de casaminoacidos e meio minimo (M	MH)28 20
3.1.8 Avaliação da expressão a temperatura de 20°C	29 30
3.1.9. Expressão em escala preparativa da rTs8 e rTs8-propeptídeo com casamino	nácidos.
5.2. PURIFICAÇÃO DAS TOXINAS RECOMBINANTES E CLIVAGEM DA E DE POLI-HISTIDINA	CEGIAU 31
3.3. PURIFICAÇÃO DAS TOXINAS NATIVAS	
3.3.1. Peconha de <i>Tityus serrulatus</i>	
3.3.2. Cromatografia em troca catiônica CM-celulose-52	
3.3.3. Cromatografia em fase reversa da fração VIIIB.	
3.4. CARACTERIZAÇÃO DAS TOXINAS NATIVAS E RECOMBINANTES	
3.4.1. Espectrometria de massas	
3.4.2. Sequenciamento aminoterminal por degradação de Edman	
3.4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida	35
3.4.4. Quantificação das proteínas	
3.4.5. Ensaios eletrofisiológicos com a rTs8.	
3.4.6. Avaliação da liberação ou indução de citocinas de macrófagos alveolares	
5.4.0.1. Cultivo de celulas de lilliagem AMJ2-C11	

3.4.6.2. Ensaio de citotoxicidade – MTT ((3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazó	ólio
– Sal de tetrazólio)	37
3.4.6.3. Determinação da concentração de citocinas	38
3.4.6.4. Determinação da concentração de Nitrito	38
3.4.7. Atividades antimicrobianas	38
3.4.8. Análise estatística	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO DAS TOXINAS	
RECOMBINANTES	41
4.1.1. Desenho de genes sintéticos para a expressão da Ts8 e Ts8-propeptídeo (scorp	vine-
like	41
4.1.2. Transformação em células de Pichia pastoris	43
4.1.3. Triagem da expressão das diferentes colônias em placa em meio BMMY	46
4.1.4. Expressão em escala preparativa com meio BMMY e purificação da rTs8	49
4.1.5. Expressão da rTs8 com meio BMMY, PMSF e purificação	54
4.1.6. Expressão em escala preparativa em meio BMMY e purificação da rTs8-	
propeptídeo.	60
4.1.7. Avaliação da expressão da rTS8 e rTs8-propeptídeo com adição de casaminoác	idos
e meio minimo. $(1 - 1)$	62
4.1.8. Avaliação da expressão da r188 e r188-propeptideo com inibidores de proteases	300
4.1.9. Avanação da expressão da F188 e F188-propeptideo com diminuição da tempera	
1 1 10 Expressão em escala preparativa da rTe8 com adição de casaminoácidos	08
4.1.10. Expressão em escala preparativa da rTs8-propentídeo com adição de	70
4.1.11. Expressão em escara preparativa da 1180-propopuldeo com adição de casaminoácidos	77
cusummouclos.	/ /
4.2. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS TOXINAS NATIVAS	81
4.2.1. Cromatografia da peconha de <i>T. serrulatus</i> em CM-celulose-52	81
4.2.2. Purificação da Ts8 e Ts8-propeptídeo (<i>scorpine-like</i>)	82
4.3. ENSAIOS FUNCIONAIS	84
4.3.1. Estudo Eletrofisiológico com a rTs8 Frag.	84
4.3.2. Avaliação da liberação ou indução de citocinas de macrófagos alveolares pelas	
toxinas	87
4.3.2.1. Ensaio de citotoxicidade – MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazó	io –
Sal de tetrazólio)	87
4.3.2.2. Dosagem de citocinas	88
4.3.2.3. Determinação da concentração de nitrito	90
4.3.3. Atividade antimicrobiana	91
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
6. REFERÊNCIAS	98



1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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



*Dados coletados até Outubro de 2015 e sujeitos à revisão

B



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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

As neurotoxinas de escorpiões são divididas em 4 grupos: 1) peptídeos com atividade moduladora de canais para Na⁺; 2) peptídeos com atividade bloqueadora de canais para K⁺; 3) peptídeos que inibem canais para Cl⁻ e 4) peptídeos que modulam a atividade de canais para Ca²⁺ (SILVA et al., 2009). Sendo que as toxinas que atuam em canais para Na⁺ e para K⁺ são as mais descritas e estudadas.

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

1.1. Toxinas de escorpião e canais para sódio

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2. Toxinas de escorpião e canais para potássio

Os canais para potássio possuem a maior e a mais diversificada família de canais iônicos. Entre as famílias podemos citar a 2TM-Kir, a 4TM, os canais para potássio dependentes de voltagem (Kv), os Sk e Slo (Fig. 4) (GONZÁLEZ et al., 2012).

Entre os tipos conhecidos de canais para K^+ , o maior grupo são os canais para potássio dependentes de voltagem (K_V), que nos humanos estão agrupados em 12 subfamílias, $K_V 1 - K_V 12$, que se diferenciam pelas estruturas (números de segmentos transmembrana) e funções (SWARTZ, 2004; GRIZEL et al., 2014).

Os canais para potássio do tipo *Shaker*, por exemplo, estão associados à subfamília K_V1 ($K_V1.1$ - $K_V1.8$) e são bem estudados, sendo grande parte dos bloqueadores desses canais provenientes de peçonhas animais (MOUHAT et al., 2008). Eles constituem o maior alvo para toxinas de escorpiões e possuem um papel importante na liberação do Ca²⁺, na secreção proliferação e migração celular (MARTIN-EAUCLAIRE et al., 2016).

Já as isoformas $K_V 2.1$ e $K_V 2.2$ pertencem à subfamília *Shab*, também conhecida como $K_V 2$. Elas são encontradas em células de órgãos como cérebro, coração, rim, pulmão, retina e pâncreas. Apresentam ligantes específicos para toxinas de alguns aracnídeos, como aranhas, e com a toxina Ts15, isolada do *T. serrulatus* (MOUHAT et al., 2008; PUCCA, BERTOLINI, et al., 2016).

Outras subfamílias de canais para potássio são a *Shaw* (Kv3), encontrada no cérebro, e a *Shal* (Kv4) com 3 isoformas, presentes no cérebro, musculatura lisa e coração, as quais são bloqueadas por toxinas de escorpiões e aranhas. Já as subfamílias Kv5, Kv6, Kv8 e Kv9 podem desenvolver canais heteromultiméricos com subunidades α da subfamília Kv2. Porém, quando sozinhas, não são capazes de compor canais funcionais para potássio (MOUHAT et al., 2008).

A subfamília *Eag* (K_V10 , K_V11 e K_V12) foi a última a ser descrita, e suas isoformas foram encontradas no sistema nervoso central. Sabe-se pouco sobre essas isoformas, porém a $K_V10.1$ ou EAG, tem sido estudada e relacionada com transformações oncogenéticas (MOUHAT et al., 2008).



Fonte: González et al. 2012 modificada.

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3. Toxinas de escorpião com atividade antimicrobiana

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4. Ts8 e Ts8-propeptídeo

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

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

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

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

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

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

1.5. Clonagem e expressão de toxinas

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

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

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

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

Bactérias como a *E. coli* não são capazes de realizar modificações pós-traducionais. Esse é um dos motivos que faz com que a *P. pastoris* possua vantagens na expressão de toxinas. Além disso, a *P. pastoris* possui o gene AOX1 (promotor de álcool oxidase 1) induzível pela adição de metanol, que está conjugado com o peptídeo sinal de *Saccharomyces cerevisae*. Isso permite que a proteína expressa seja secretada para o meio, facilitando sua purificação (LI, 2011). Os sistemas de expressão em leveduras, como a *Pichia pastoris,* combinam a fácil manipulação genética e o crescimento rápido à capacidade de promover muitas das modificações pós-traducionais realizadas por células eucarióticas superiores, como processamento proteolítico, enovelamento, formação de pontes dissulfeto e glicosilações de proteínas. Esses sistemas também são capazes de secretar as proteínas expressas, o que representa uma vantagem deste sistema na expressão heteróloga de proteínas (CREGG et al., 2000; CEREGHINO; CREGG, 2000).

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

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

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

Anangi (2012) expressaram as toxinas margatoxin (MgTx) and agitoxin-2 (AgTx2) dos escorpiões *Centruroides margaritatus* e *Leiurus quinquestriatus hebraeus* em *Pichia pastoris*. Segundo os autores, ambas as toxinas já tinham sido expressas em *E.coli* e com as funções preservadas, porém em *Pichia pastoris* o rendimento foi de 6-8 vezes maior. As toxinas expressas demonstraram bloquear com elevada potência os canais K_V 1.1 e K_V 1.3 de ratos e também inibiram a proliferação de linfócitos T humanos.

No nosso laboratório, diversas toxinas já foram expressas nesse sistema com sucesso, como a serinoprotease da serpente *Crotalus durissus collilineatus*, a Ts19 Frag-II e a hialuronidase do escorpião *T. serrulatus* (BOLDRINI-FRANCA et al., 2015).
Embora os PAMs (peptídeos antimicrobianos) possam causar desestabilizações nas membranas de microrganismos, muitos desses peptídeos têm sido expressos em organismos como a *P. pastoris*. Um dos motivos é que um dos vetores mais utilizados possuem o promotor AOX, induzido por metanol. A expressão que contém esse promotor se dá em duas fases: uma de formação da biomassa, onde ocorre o aumento da densidade celular e a outra de indução da expressão, na presença de metanol. Dessa forma, pode haver uma vantagem na produção de PAMs já que a formação de biomassa ocorre antes da sua expressão, evitando assim uma possível toxicidade à célula hospedeira (PARACHIN et al., 2012; XIAO et al., 2017).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram a expressão heteróloga e caracterização das toxinas Ts8 e Ts8-propeptídeo do escorpião *Tityus serrulatus*.

Para isso, foram realizados:

- Seleção dos cDNAs da toxina Ts8-propeptídeo para clonagem e expressão heteróloga a partir de sequência obtida do transcriptoma da glândula de peçonha de *T. serrulatus*
- Desenho de genes sintéticos da Ts8 e Ts8-propeptídeo para a expressão heteróloga
- Avaliação das melhores colônias para expressão das toxinas
- Expressão das toxinas em escala preparativa com meio BMMY
- Expressão da rTs8 em escala preparativa com meio BMMY e PMSF
- Avaliação da rTs8 e rTs8 propeptídeo em diferentes condições de expressão
- Purificação das toxinas nativas e recombinantes por métodos cromatográficos
- Espectrometria de massas para identificação das toxinas nativas e recombinantes
- Estudo eletrofisiológico da rTs8
- Avaliação da liberação de citocinas e óxido nítrico das toxinas nativas e recombinantes
- Atividade antimicrobiana das toxinas nativas e recombinantes

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

As principais etapas realizadas neste trabalho estão representadas na figura 6 abaixo:



Figura 6. Fluxograma representativo das principais etapas realizadas no presente trabalho. O fluxograma representa as principais etapas realizadas com as toxinas nativas e recombinantes. Em vermelho estão destacadas as atividades funcionais realizadas com as toxinas.

3.1. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DAS TOXINAS RECOMBINANTES

3.1.1. Desenho dos genes sintéticos

Os desenhos dos genes da Ts8 e Ts8-propeptídeo (*scorpine-like*) foram realizados tendo como base as sequências de nucleotídeos obtidas da biblioteca da glândula de T. *serrulatus* (AMORIM, 2015) e inseridos no vetor de expressão pPICZ α A da levedura *P. pastoris*. Além disso, foram adicionadas sequências que constituem sítios clivagem de enzimas como a enteroquinase para a Ts8 e a TEV (vírus etch do tabaco) para a Ts8-propeptídeo (*scorpine-like*), visando a posterior remoção da região de poli-histidina. Foi realizada a otimização dos códons, os genes foram sintetizados pela GenScript[®] e clonados em vetor pPICZ α A também pela GenScript[®].

3.1.2. Transformação dos genes sintéticos em Pichia pastoris

Cerca de 5 μ g dos genes sintéticos contendo os plasmídeos recombinantes da Ts8, Ts8-propeptídeo foram linearizados com 1 μ L (10 U) da enzima de restrição *PmeI (New England Biolabs*, Reino Unido). Após a linearização, os plasmídeos foram utilizados para a transformação em células competentes de *Pichia pastoris* (linhagem KM71H). O protocolo utilizado para tornar as células de *P. pastoris* competentes foi descrito anteriormente por Cregg (2007).

Os DNAs plasmidiais linearizados (229 ng da Ts8 e 500 ng da Ts8-propeptídeo) foram incubados com 40 μ L de células competentes por 5 min. A suspensão contendo as células e o material genético foi transferida para cubetas de 0,2 cm (*Bio-Rad*, EUA) e submetida à eletroporação no equipamento *GenePulser II* (*Bio-Rad*, EUA) nas seguintes condições: 1500 V, 25 μ F, 200 Ω . O mesmo foi realizado com o plasmídeo sem o inserto como controle negativo de expressão. Após a eletroporação, 50, 100 e 200 μ L de células foram plaqueadas em meio YPDS ágar [extrato de levedura 1% (m/V), peptona 2% (m/V), dextrose 2% (m/V), sorbitol 1 M e ágar 2% (m/V)] contendo zeocina (100 μ g/mL) e incubadas a 30°C por 3 dias.

As colônias transformantes foram submetidas a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase – *Polymerase Chain Reaction*) de colônia e o produto da reação foi visualizado em gel de agarose 1%, para a confirmação da incorporação do inserto no DNA genômico na levedura. Foram utilizados os oligonucleotídeos 5⁻ correspondentes à Ts8 e Ts8-propeptídeo, e oligonucleotídeo antissenso 3'AOX do vetor pPICZαA ambos a 10 mM.

3.1.3. Seleção em meio BMMY da melhor colônia para expressão em escala preparativa

As colônias que apresentaram resultado positivo para presença do inserto na análise do PCR de colônia foram selecionadas e individualmente inoculadas em placas de 24 poços *deep well* (*Whatman*, EUA) contendo inicialmente 3 mL de meio BMGY [extrato de levedura 1% (m/V), peptona 2% (m/V), YNB 1,34% (m/V), 4 x 10⁻⁵ biotina (m/V), glicerol 1% (m/V), fosfato de potássio 100 mM pH 6,0] e 1 μ L do antibiótico zeocina (100 mg/mL) por poço, para geração da biomassa. Dois poços das placas foram utilizados como controles negativos: um contendo o controle negativo da expressão, ou seja, uma colônia que contêm o plasmídeo pPICZ α A sem o inserto de expressão, e o outro sem colônia alguma, para avaliarmos possível contaminação do processo de expressão. A placa foi incubada por 48 h a 30°C sobre agitação de 190 rpm.

Para a indução, a placa foi centrifugada a 1500 xg e o meio foi substituído por 2 mL do meio BMMY, que contém extrato de levedura 1% (m/V), peptona 2% (m/V), YNB 1,34% (m/V), 4 x 10⁻⁵ biotina (m/V), metanol 0,5% (V/V), fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0. A placa foi incubada a 26°C, agitada a 190 rpm, por 144 h. A cada 24 h era adicionado metanol 100% (V/V) para uma concentração final de 0,75% por poço. Além disso, uma alíquota da expressão era coletada, centrifugada a 4000 xg e submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 16,5% conforme item 3.4.3.

A colônia que mostrou melhor expressão da toxina foi então submetida à expressão em escala preparativa.

3.1.4. Expressão em escala preparativa em meio BMMY

Inicialmente, as colônias escolhidas foram submetidas a uma expressão padrão segundo o manual *Easy Select Pichia Expression (Invitrogen*, EUA). Nessa expressão foi realizado o pré-inóculo das colônias em erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de meio BMGY [extrato de levedura 1% (m/V), peptona 2% (m/V), YNB 1,34% (m/V), 4 x 10⁻⁵ biotina (m/V), glicerol 1% (m/V), fosfato de potássio 100 mM pH 6,0] e 5 μ L do antibiótico zeocina (100 mg/mL). A suspensão foi incubada a 30°C sob agitação constante de 190 rpm. Após 16 h, a cultura foi transferida para um erlenmeyer de 2 L, contendo 500 mL de meio BMGY, e incubada a 30°C sob agitação constante de 190 rpm, por 24 h. Após este período, a cultura foi centrifugada a 1500 xg, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 100 mL de meio BMMY [YNB 1,34% (m/V), 4 x 10^{-5} biotina (m/V), metanol 0,5% (V/V), fosfato de potássio 100 mM pH 6,0] em erlenmeyer de 1 L à 26°C, sob agitação constante de 190 rpm.

Para a indução da expressão das toxinas, foi realizada adição de metanol para a concentração final de 0,75% a cada 24 h. Além disso, foram coletadas alíquotas do meio para avaliação da expressão em SDS-PAGE. Após 144 h de indução, a cultura foi centrifugada a 1.500 xg por 10 minutos, o sobrenadante foi filtrado em membrana de poro de 0,45 μ m e fracionado como descrito no item 3.2.

3.1.5. Expressão em escala preparativa da rTs8 com adição de PMSF.

A expressão da rTs8 com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil, inibidor de serinoproteases) foi realizada como no item anterior (3.1.4), porém ao invés da adição de metanol 0, 75%, foram adicionados metanol 0,25% e 0,5%, a partir de uma solução contendo PMSF (200 mM) solubilizado em metanol. O PMSF foi solubilizado em metanol, pois não é estável em solução aquosa. Após 96 h de indução, a cultura foi centrifugada a 1.500 xg por 10 minutos, o sobrenadante foi filtrado em membrana de poro de 0,45 μ m e fracionado com descrito no item 3.2.

3.1.6. Avaliação da expressão na presença de casaminoácidos e meio mínimo (MMH).

Visando a otimização da expressão foram realizados ensaios utilizando duas placas de 24 poços *deep well* (*Whatman*, EUA): uma para a rT8 e outra para a rTs8-propeptídeo. Inicialmente foram geradas as biomassas: as células de levedura transformada foram inoculadas em 3 mL de meio BMGY [extrato de levedura 1% (m/V), peptona 2% (m/V), YNB 1,34% (m/V), 4 x 10⁻⁵ biotina (m/V), glicerol 1% (m/V), fosfato de potássio 100 mM pH 6,0] contendo 1 μ L do antibiótico zeocina (100 mg/mL). Dois poços das placas foram utilizados como controles negativos: um contendo o controle negativo da expressão, ou seja, uma colônia que contêm o plasmídeo pPICZ α A sem o inserto de expressão, e outro sem colônia alguma, para avaliarmos possível contaminação do processo de expressão. As placas foram incubadas por 48 h a 30°C sobre agitação de 190 rpm.

Para a indução da expressão, as placas foram centrifugadas a 1500 xg, os sobrenadantes recolhidos e nos poços contendo os controles negativos e a expressão com meio BMMY foram adicionados 2 mL do meio BMMY, que contém o meio base [extrato de

levedura 1% (m/V), peptona 2% (m/V)], YNB 1,34% (m/V), 4 x 10^{-5} biotina (m/V), metanol 0,5% (V/V), fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0.

Em um poço foram adicionados 2 mL do meio BMMH, que contém YNB 1,34% (m/V), 4 x 10^{-5} biotina (m/V), metanol 0,5% (V/V) e 10 mL de uma solução 0,4% de histidina.

Aos poços nos quais foi avaliada a influência dos casaminoácidos (CA) foram adicionados 2 mL do meio BMMY: meio base [extrato de levedura 1% (m/V), peptona 2% (m/V)], YNB 1,34% (m/V), 4 x 10^{-5} biotina (m/V), metanol 0,5% (V/V), fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0, e casaminoácidos (Difco) nas concentrações de 2,5, 5, 10 e 20 g/L. As concentrações dos casaminoácidos são em relação ao meio base e não ao volume final do poço. Após a indução as placas foram incubadas a 26°C por 144 h.

A cada 24 h foi adicionado metanol 100% (V/V) para uma concentração final de 0,75% por poço e alíquotas foram coletadas, centrifugadas a 4000 xg e submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 16,5%.

3.1.7. Avaliação da expressão na presença de inibidores de proteases.

Visando a otimização da expressão foram realizados ensaios na presença de inibidores de protease, utilizando uma placa de 24 poços *deep well* (*Whatman*, EUA). Inicialmente, foram geradas as biomassas. As células transformadas foram inoculadas em poços contendo 3 mL de meio BMGY [extrato de levedura 1% (m/V), peptona 2% (m/V), YNB 1,34% (m/V), 4 x 10^{-5} biotina (m/V), glicerol 1% (m/V), fosfato de potássio 100 mM pH 6,0] e 1 µL do antibiótico zeocina (100 mg/mL). Dois poços das placas foram utilizados como controles negativos: um contendo o controle negativo da expressão, ou seja, uma colônia que contêm o plasmídeo pPICZ α A sem o inserto de expressão e outro sem colônia alguma, para avaliarmos possível contaminação do processo de expressão. A placa foi incubada por 48 h, a 30°C, sobre agitação de 190 rpm.

Para a indução da expressão, as placas foram centrifugadas a 1500 x*g*, os sobrenadantes recolhidos e aos poços contendo os controles negativos e as expressões com meio BMMY foram adicionados 2 mL do meio BMMY, que contém o meio base [extrato de levedura 1% (m/V), peptona 2% (m/V)], YNB 1,34% (m/V), 4 x 10⁻⁵ biotina (m/V), metanol 0,5% (V/V), fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0.

Na expressão com meio BMMY + CA 2,5 g/L foram adicionados 2 mL do meio BMMY: meio base [extrato de levedura 1% (m/V), peptona 2% (m/V)], YNB 1,34% (m/V), 4 x 10^{-5} biotina (m/V), metanol 0,5% (V/V), fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0, e casaminoácidos (Difco) na concentração de 2,5 g/L.

As expressões com PMSF foram realizadas com meio BMMY. Porém, ao invés da adição de metanol 0,75% na alimentação, foram adicionados metanol 0,25% e 0,5% de uma solução contendo PMSF (200 mM) solubilizados em metanol.

Nos poços nos quais foi avaliada a influência de inibidores de proteases, foram adicionados 100 µL de uma solução de inibidores de proteases (10X) SigmaFAST[®] Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA Free (SIGMA-ALDRICH[®]), nos tempos 0 h e 72 h. Além disso, nessas placas a cada 24 h foi adicionado metanol 100% (V/V) para uma concentração final de 0,75% por poço. Após a indução, as placas foram incubadas a 26°C por 144 h.

Nas demais placas a cada 24 h foi adicionado metanol 100% (V/V) para uma concentração final de 0,75% por poço. E a cada 24 h foram coletadas alíquotas de todos os poços centrifugadas a 4000 xg e submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 16,5%.

3.1.8. Avaliação da expressão a temperatura de 20°C.

Visando a otimização da expressão foi avaliada a expressão das toxinas à temperatura de 20°C. Foi utilizada uma placa de 24 poços *deep well* (*Whatman*, EUA). Inicialmente, as células transformadas foram inoculadas em poços contendo 3 mL de meio BMGY [extrato de levedura 1% (m/V), peptona 2% (m/V), YNB 1,34% (m/V), 4 x 10⁻⁵ biotina (m/V), glicerol 1% (m/V), fosfato de potássio 100 mM pH 6,0] e 1 μ L do antibiótico zeocina (100 mg/mL), para gerar a biomassa. Dois poços das placas foram utilizados como controles negativos: um contendo o controle negativo da expressão, ou seja, uma colônia que contêm o plasmídeo pPICZ α A sem o inserto de expressão e outro sem colônia alguma, para avaliarmos possível contaminação do processo de expressão. A placa foi incubada por 48 h, a 30°C, sobre agitação de 190 rpm.

Para a indução da expressão, a placa foi centrifugada a 1500 xg, os sobrenadantes recolhidos e aos poços contendo os controles negativos e as expressões com meio BMMY (um para a Ts8 e outro para a Ts8-propeptídeo) foram adicionados 2 mL do meio BMMY,

que contém o meio base [extrato de levedura 1% (m/V), peptona 2% (m/V)], YNB 1,34% (m/V), 4 x 10^{-5} biotina (m/V), metanol 0,5% (V/V), fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0.

Após a indução com metanol, a placa foi incubada a 20°C por 144 h e, a cada 24 h, foi adicionado metanol 100% (V/V), para uma concentração final de 0,75% por poço. A cada 24 h foram coletadas alíquotas de todos os poços, centrifugadas a 4000 xg e submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 16,5%.

3.1.9. Expressão em escala preparativa da rTs8 e rTs8-propeptídeo com casaminoácidos.

As expressões em escala preparativa das toxinas com casaminoácidos foram realizadas conforme o item 3.1.4. Porém, na indução, as células transformadas foram adicionadas ao meio BMMY + CA [YNB 1,34% (m/V), 4 x 10⁻⁵ biotina (m/V), metanol 0,5% (V/V), fosfato de potássio 100 mM pH 6,0 + CA 2,5 g/L] em erlenmeyer de 1 L, à 26°C, sob agitação constante de 190 rpm, por 24 h. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 1.500 x*g* por 10 minutos, o sobrenadante foi filtrado em membrana de poro de 0,45 μ m e fracionado como descrito no item 3.2.

3.2. PURIFICAÇÃO DAS TOXINAS RECOMBINANTES E CLIVAGEM DA REGIÃO DE POLI-HISTIDINA.

Após a expressão em escala preparativa, as culturas foram centrifugadas a 1500 xg por 10 minutos, os sobrenadantes foram filtrados com membrana 0,45 μ m (MilliporeTM) e aplicados a uma coluna de afinidade do tipo IMAC (*Immobilized-Metal Affinity Chromatography*). No caso, a coluna utilizada foi a que contém resina de Níquel, N-NTA Agarose (Qiagen). Para o fracionamento foram utilizados dois tampões, o tampão A que contém Tris-HCl (10 mM), Na₂PO₄ (50 mM) e NaCl (100 mM) em pH 8 e tampão B contendo tampão A mais imidazol (250 mM) também em pH 8. A eluição ocorre à medida que a concentração de B aumenta. Inicialmente, o sobrenadante da expressão é aplicado na coluna e o material que não interagiu com a mesma é recolhido (*fração excluída da coluna*). Após isso, 15 mL de tampão A são aplicados e o volume recolhido é chamado de *lavado da expressão*. A partir daí são adicionados 2 volumes de coluna (VC; 1 VC = 5 mL) das concentrações de imidazol na seguinte ordem: *Gradiente 1*: 10 mM de imidazol (G1a: primeiro VC e G1b: segundo VC); *Gradiente 2*: 25 mM de imidazol (G2a: primeiro VC e

G2b: segundo VC); *Gradiente 3*: 50 mM de imidazol (G3a: primeiro VC e G3b: segundo VC); *Gradiente 4*: 75 mM de imidazol: (G4a: primeiro VC e G4b: segundo VC); *Gradiente 5*: 100 mM de imidazol: (G5a: primeiro VC e G5b: segundo VC) e 3 VC do *gradiente 6*: 250 mM de imidazol (G6a: primeiro VC, G6b: segundo VC e G6c: terceiro VC).

As amostras que apresentaram as proteínas recombinantes foram reunidas e concentradas em tubos cônicos tipo falcon contendo filtros para centrífuga do tipo Amicon® Ultra- 15 *Centrifugal Filter Devices* (3.000 Da) a 4.000 xg, lavados com água e novamente centrifugados. O material retido foi submetido à cromatografia de fase reversa em coluna semipreparativa C18 (250 x 10,0 mm, com partículas de 5 μ m, 300A, Jupiter, Phenomenex), acoplada a sistema FPLC Äkta UPC 900, e eluído com uma solução de TFA 0,1% (Solução A), sob vazão de 2 mL/min. Após a eluição de aproximadamente 40 mL, iniciou-se um gradiente linear de concentração de solução B (TFA 0,1% + acetonitrila 80%) até atingir 100% de B.

Após isso, com a fração escolhida (25 μ g), foi realizada uma reação para a clivagem da região de poli-histidina com 0,00016 μ g da enzima enteroquinase 2.0 μ g /mL (*Enterokinase-New England Biolabs*[®]) por 16 h a 25°C. O volume de reação foi então submetido a uma cromatografia de fase reversa em coluna C18 para peptídeos (250 x 2,1 mm, com partículas de 5 μ m, Vydac, Grace), acoplada a sistema FPLC Äkta UPC 900 e eluído com uma solução de TFA 0,1% (Solução A), sob vazão de 0,3 mL/min. Após a eluição de aproximadamente 4 mL, iniciou-se um gradiente linear de concentração de solução B (TFA 0,1% + acetonitrila 80%) até atingir 100% de B.

3.3. PURIFICAÇÃO DAS TOXINAS NATIVAS

3.3.1. Peçonha de Tityus serrulatus

Os escorpiões da espécie *T. serrulatus* foram obtidos na região de Ribeirão Preto e mantidos no serpentário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), de acordo com as normas do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) (ANEXO I).

A peçonha de *T. serrulatus* foi obtida através de eletroestimulação da glândula com voltagem de 12 V de cerca de 200 animais.

3.3.2. Cromatografia em troca catiônica CM-celulose-52

A peçonha de *Tityus serrulatus* foi dessecada e cerca de 50 mg foram dispersos em 0,5 mL de bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8, e centrifugados a 15.700 x g a 4°C, por 10 minutos. O precipitado foi ressuspendido por mais três vezes, resultando em cerca de 2 mL de peçonha solúvel, os quais foram armazenados durante 12 h a 4°C e, posteriormente, novamente centrifugados a 15.700 x g a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para o fracionamento em coluna de CM-Celulose-52.

A cromatografia foi realizada segundo Arantes et al. (1989) e modificada por Cerni (2014). Uma coluna de 1,6 x 100 cm foi empacotada com resina CM-celulose-52 microgranular (*Whatman, Maidstone, England*). Após o empacotamento, a coluna foi equilibrada com uma solução de bicarbonato de amônio 0,05 M durante 10 h, sob vazão de 0,5 mL/min. A coluna foi inicialmente eluída com uma solução de bicarbonato de amônio 0,05 mol/L, pH 7,8 (100% de Tampão A) e foi iniciado então um gradiente linear de concentração de bicarbonato de amônio 0,6 M (Tampão B) até atingir 100% de Tampão B após 440 mL de eluição. A concentração (100% de B) foi mantida por mais 140 mL, decaindo para 0% de Tampão B.

3.3.3. Cromatografia em fase reversa da fração VIIIB.

A fração VIIIB (400 μ g), obtida da cromatografia em CM-celulose-52, foi dispersa em 500 μ L de solução de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (V/V) e submetida à cromatografia em uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm, com partículas de 5 μ m, Jupiter, Phenomenex), acoplada a sistema FPLC Äkta UPC 900 e eluída com uma solução de TFA

0,1% (Solução A), sob vazão de 0,7 mL/min. Após a eluição de aproximadamente 2 mL, iniciou-se um gradiente linear de concentração de solução B (TFA 0,1% + acetonitrila 80%) até atingir 100% de B.

3.4. CARACTERIZAÇÃO DAS TOXINAS NATIVAS E RECOMBINANTES

3.4.1. Espectrometria de massas

A determinação da massa molar das frações obtidas no item nos itens 3.1.4, 3.1.9 e 3.3 foi realizada na Central de Cromatografia e Espectrometria de Massas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão através de espectrometria de massas tipo MALDI-TOF (*Matrix Assited Laser Desorption/Ionization – Time of Flight*). As soluções das amostras (10 μ g/ μ L) foram cossedimentadas com as matrizes ácido 2,5 dihidrobenzóico (DHB - 10 mg/mL) ou ácido α -ciano 4-hidroxicinâmico (HCCA - 5 mg/mL) dispersas em solução 0,2% de TFA 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 e analisadas em espectrômetro de massas TOF (MALDI-TOF), modelo Ultraflex II (Bruker Daltonics - DE), equipado com uma fonte de laser do tipo Nd-YAG Smartbeam laser (MLN 202, LTB), operado no modo positivo linear ou refletido.

A determinação da massa molar da amostra expressa nas condições descritas no item 3.1.5 foi realizada no *Laboratory of Protein Phosphorylation and Proteomics* na Universidade Católica de Leuven em Leuven na Bélgica utilizando um espectrômetro de massas por MALDI-TOF (*Matrix Assited Laser Desorption/Ionization – Time of Flight*), modelo 4800, *Analyser, Apllied Biosystems*, EUA. O espectro foi adquirido no modo positivo linear em matriz HCCA.

3.4.2. Sequenciamento aminoterminal por degradação de Edman

O sequenciamento amino-terminal das amostras foi realizado pelo método de degradação de Edman (EDMAN e BEGG, 1967). As proteínas foram submetidas à análise em um Sequenciador de Proteínas Automatizado da marca Shimadzu (Sistema PPSQ-33A). Os sequenciamentos foram realizados no Laboratório de Toxinas Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

3.4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (dodecil sulfato de sódio) e tricina a 16,5% foi realizado segundo Schagger e Von Jagow (1987).

Nessa eletroforese são utilizados dois tampões diferentes: o tampão do cátodo (Tris-HCl 0,1 mol/L, tricina 0,1 mol/L e SDS 0,1%, pH 8,25), que fica na região superior da cuba, e o tampão do ânodo (Tris-HCl 0,2 mol/L, pH 8,9), que fica na parte inferior da cuba. O tampão de amostra utilizado continha Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10% e azul de bromofenol 1 mmol/L e o padrão utilizado foi o Padrão de Ultra Baixa Massa Molecular da Sigma[®] (1,060-26,600 kDa).

As condições da corrida foram: 85V, 10 mA por gel (quando o indicador atingiu a região inferior do gel a corrente foi mudada para 20 mA) e 10W por aproximadamente 5 h. A coloração utilizada foi a coloração de prata segundo Kavran e Leahy (2014), com modificações.

3.4.4. Quantificação das proteínas

Para a quantificação de proteínas, foi utilizado o método de Scopes (1974), que utiliza a leitura da absorbância em dois comprimentos de onda, 280 nm e 205 nm.

3.4.5. Ensaios eletrofisiológicos com a rTs8.

Os ensaios de eletrofisiológicos utilizando a técnica de *voltage-clamp* com dois microeletrodos em oócitos de *Xenopus laevis* foram realizados no Laboratório de Toxicologia da Universidade Católica de Leuven, Bélgica, supervisionado pelo professor Dr. Jan Tytgat

Oócitos de rãs da espécie *Xenopus laevis* mantidos no biotério *Aquatic Facitily* da Universidade Católica de Leuven foram isolados através de ovariectomia parcial. Os animais foram anestesiados em um recipiente com solução de tricaína (1 g/L) por 20 minutos e mantidos em gelo durante toda a cirurgia. Foi realizada uma incisão de cerca de 1 cm na região lateral dorsal do animal e, com auxílio de uma pinça, os oócitos foram retirados. Os oócitos foram defoliculados e tratados com solução de colagenase 2,5 mg/mL em solução ND96- livre de cálcio (NaCl 96; KCl, 2; MgCl₂, 2 e HEPES, 5 em pH 7,4), por 1 h e 30 min, a 15-16 °C. Após o tratamento, os oócitos dos estágios V e VI da maturação foram

selecionados para posterior injeção dos cRNAs correspondentes às proteínas que formam os diferentes canais para potássio presentes no laboratório.

Os cRNA utilizados foram transcritos e sintetizados a partir dos plasmídeos linearizados utilizando kit de transcrição (T7 ou SP6 mMESSAGE mMACHINE, Ambion[®], EUA). Os oócitos traduzem o cRNA injetado das suas respectivas proteínas (no caso canais para potássio $K_V 1.1$, $K_V 1.3$ e ShakerIR), que, após serem expressas, inserem-se na membrana celular dos mesmos. Foram injetados de 1 a 60 nL dos respectivos cRNAs com um auxílio de um micro injetor (Drummond Scientifc®, EUA). O tempo de espera para a expressão dos canais $K_V 1.1$, $K_V 1.3$ foi de 1 a 3 dias e para o canal ShakerIR foi de 3 a 4 dias. Os oócitos que estavam expressando os canais para potássio foram utilizados para os ensaios eletrofisiológicos.

Os registros das medidas eletrofisiológicas foram realizados em uma sala à temperatura ambiente (18-22°C), utilizando um amplificador Gene Clamp 500 (Axon Instruments, EUA), controlado por um sistema de aquisição de dados Clampex10 (Axon Instruments, EUA). A resistência foi de 0,6 a 1,0 M Ω para os dois eletrodos. As correntes dos oócitos foram registradas 1 a 3 dias após a injeção do cRNA para os canais para potássio. Foram utilizados 1 µM da toxina aplicada diretamente na câmara onde o oócito estava acomodado em solução ND-96 (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, MgCl₂ 2 mM, 1.8 CaCl₂, e HEPES 5 mM). Os dados foram analisados utilizando o software Clampfit (Molecular Devices, Sunnyvale, Ca) transferidos para planilha em Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, WA) e os gráficos realizados no software Origin 9.0 (OriginLab Corp., Northampton, EUA).

O protocolo de pulso de voltagem para os K_{VS} testados neste trabalho está demonstrado na figura 7 abaixo:



Figura 7. Protocolo de pulso de voltagem usado para canais dos tipos Kv1.1, Kv1.3 e ShakerIR.

3.4.6. Avaliação da liberação ou indução de citocinas de macrófagos alveolares

Os ensaios descritos abaixo foram realizados em colaboração com o laboratório de Inflamação e Imunologia das parasitoses sob a supervisão da Dra. Lúcia Helena Faccioli e da pós-doutoranda Dra. Karina Furlani Zoccal, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.4.6.1. Cultivo de células de linhagem AMJ2-C11

A linhagem de macrófagos alveolares de camundongo (AMJ2-C11) foi obtida do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). Estes macrófagos foram cultivados em garrafas plásticas, em meio RPMI 1640 acrescido de 10% de soro bovino fetal (SBF) (RPMI-c). Após a formação das monocamadas de células, as mesmas foram removidas e centrifugadas (400 x g, 10 min., a 10°C). O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspendido em 10 mL de RPMI-c para avaliação da viabilidade celular, em microscópio óptico. A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer e a viabilidade determinada com o corante Azul de Tripan (Gibco *Invitrogen*, EUA).

3.4.6.2. Ensaio de citotoxicidade – MTT ((3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio – Sal de tetrazólio)

Uma suspensão de macrófagos alveolares foi ajustada para 2 x 10^5 células/poço/200 µL, em meio de cultura RPMI 1640 incompleto (sem SBF) adicionado de antibiótico. As células foram plaqueadas em microplaca de 96 cavidades e incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 18 h para a adesão. Após este período, o meio de cultura foi substituído por 200 µL de meio de cultura contendo diferentes concentrações da peçonha bruta ou das toxinas. Após 24 h de incubação, o sobrenadante foi coletado e guardado a – 20°C para posterior dosagem de citocinas e óxido nítrico, e foi adicionado às células o meio de cultura RPMI (200 µL/poço) sem soro e sem vermelho de fenol, mas contendo o corante brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5difeniltetrazólio (MTT) 0,5 mg/mL (Sigma M-5655) (MOSMANN, 1983). As células foram incubadas nas mesmas condições por 3 h. A absorbância referente a cada poço foi determinada a 550 nm em leitor de placas (mQuant, Biotec Instruments, Inc.). Para o ensaio de citotoxicidade o composto dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como controle de mortalidade, e as células não estimuladas, o controle de sobrevivência.

3.4.6.3. Determinação da concentração de citocinas

Os sobrenadantes de cultura obtidos de linhagem celular (AMJ2-C11) foram usados para quantificar citocinas (TNF- α e IL-1 β) pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Foram utilizados anticorpos específicos (purificados e biotinilados) e proteínas recombinantes, de acordo com instruções do fabricante (R & D Systems, MN, e PharMingen, San Diego, CA). A leitura da densidade óptica foi feita em 450 nm (mQuant, Biotek Instruments Inc.) e a concentração de citocinas calculada a partir da curva padrão.

3.4.6.4. Determinação da concentração de Nitrito

A detecção de NO nos sobrenadantes de cultura de células alveolares (AMJ2-C11) foi avaliada indiretamente pela quantificação de nitrito (NO⁻²) através do método de Griess (GREEN et al., 1981), empregando filtro de 540 nm.

3.4.7. Atividades antimicrobianas

Para este teste foram utilizadas placas de Petri de 15 cm de diâmetro as quais continham meio ágar Müller-Hinton suplementado com 2% de *d*-glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno (seguindo Norma M44-A2 de 2009 do *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI*) para a bactéria e meio YPDS (*Yeast Extract Peptone Dextrose Medium*) para o fungo. A bactéria *E. coli* (ATCC 25922) e o fungo *Pichia pastoris* (cepa KM71H) foram ajustados na escala de 0,5 McFarland (1,5 x 10^8 UFC/mL). Após ajuste, ambos foram diluídos 1:10 em PBS e com auxílio de um *swab*, foram estriadas em duas placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton, resultando em quatro placas (2 com *E. coli* e 2 com *P.pastoris*).

Para esse teste, 5 e 10 µg das toxinas nativas e recombinantes foram dispersas separadamente em 50 µL de solução salina 0,9% esterilizada e aplicadas em poços (profundidade mediana) feitos nas placas com auxílio de uma ponteira P1000 cortada na ponta. Como controle positivo para a bactéria foi utilizada uma solução de Ampicilina (500 mg/mL) e para o fungo uma solução de Anfotericina B (64 µg/mL). Como controle negativo, 50 µL de solução salina 0,9% esterilizada. Após a aplicação das amostras e dos controles (50 µL), as placas foram incubadas por 24 h a 35°C para a bactéria e 72 h a 30°C para o fungo. Ao término da incubação, o diâmetro dos halos de inibição foi medido com auxílio de um paquímetro digital *Absolute*, 200 mm com resolução de 0,01 mm (Mitutoyo, Brasil).

A cepa de *E.coli* e o meio ágar Müller-Hinton suplementado com 2% de *d*-glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno foram gentilmente cedidos pela Prof. Dr. Juliana Pfrimer Falcão, do laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

3.4.8. Análise estatística

As análises estatísticas dos ensaios foram realizadas através do teste de análise de variância ANOVA seguido de Tukey para múltiplas comparações, considerando os resultados de p < 0.05 como significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. REULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO DAS TOXINAS RECOMBINANTES

4.1.1. Desenho de genes sintéticos para a expressão da Ts8 e Ts8-propeptídeo (*scorpine-like*).

A biblioteca de cDNA de *T. serrulatus* foi realizada anteriormente em nosso laboratório pela aluna de doutorado Fernanda Gobbi Amorim. Dessa biblioteca foram obtidas várias sequências, incluindo a sequência de cDNA que codifica as toxinas de interesse deste trabalho (Ts8 e Ts8-propeptídeo) (AMORIM, 2015).

Incialmente, no presente trabalho, várias tentativas de clonagem molecular tradicional foram realizadas (dados não apresentados). Não foi possível ligar os genes da Ts8 e da Ts8-propeptídeo ao vetor de expressão escolhido. Dessa forma, optou-se por desenhar os genes tendo como base as sequências obtidas da biblioteca de cDNA, e os mesmos foram sintetizados e clonados no vetor de expressão pela GeneScript[®].

Aos genes sintéticos, foram adicionadas sequências adaptadoras que codificam sítios de clivagem de enzimas como a enteroquinase, no caso da Ts8, e a endopeptidase denominada TEV (vírus *etch* do tabaco), para a Ts8-propeptídeo (*scorpine-like*). Estas sequências permitem que, após a purificação da proteína recombinante, a região de poli-histidina seja eliminada por reações enzimáticas, garantindo que a proteína final seja idêntica à nativa (LI, 2011). Um esquema do desenho dos genes está representado abaixo (Fig. 8):

				I	50
Xhol	Kex2	His-tag	EK	Toxina	
CTCG/	AGAAAAG	ACATCATCATCA	TCATCATGATGATGA	ITGATAAGAAGTTGGTTGCTTTGATTCCAAACGATCAATTGAGATCTA	TTT
TGAA	GGCTGTTG	TTCATAAGGTT	GCTAAGACGCAATTT	GGTTGTCCAGCTTACGAAGGTTACTGTAACGATCATTGTAACGATAT	TGA
AAGA	AAGGATG	GTGAATGTCAT	GTTTTAAGTGTAAG	IGTGCTAAGGAT TGAGTCGAC	
				Chan and an - Call	
				Stop codon Sali	
				Ts8-propep	tídec

 Xhol
 Kex2
 His-tag
 Tev
 Toxina

 CTCGAGAAAAGACATCATCATCATCATCATCATGAAAACTTGTACTTTCAAGGTT
 I
 I
 I

 CTCGAGAAAAGACATCATCATCATCATCATCATGAAAACTTGTACTTTCAAGGTT
 GAGAGAAAAGCATGTTCAAAAGTTGGTTGCTTGATGATGCTTGT

 ATTCCAAACGATCATTGAGATCTATTTTGAAGGCTGTTGTTCATAAGGTTGCTAAGACGCAATTTGGTTGTCCAGCTTACGAAGGTTA

 CTGTAACGATCATTGTAACGATATTGAAAGAAAGGATGGTGAATGTCATGGTTTTAAGTGTAAGTGTGCTAAGGATTGAGTCGAC

 Stop codon
 Sall

Figura 8. **Representação esquemática do desenho dos genes sintéticos**. Ambos possuem as regiões de âncora para endonucleases de restrição (*XhoI, SalI*), *Kex2*, o *Stop códon* e a região de poli-histidina. O sítio de clivagem para enteroquinase (EK) foi adicionado à Ts8 e da Tev foi adicionado à Ts8-propeptídeo.

Os genes sintéticos foram desenhados também com âncora e sítio de clivagem para a enzima de restrição *XhoI* e sítio de clivagem para *Kex2*, âncora e sítio de clivagem para a enzima de restrição *SalI*, para permitir que os mesmos fossem posteriormente clonados no vetor de expressão de pPICZαA. A enzima TEV foi escolhida para a Ts8-propeptídeo, pois na clivagem da região de poli-histidina deixa uma glicina a mais no N-terminal e essa toxina possui como primeiro aminoácido uma glicina.

Essas sequências que são adicionadas à sequência de interesse são também chamadas de domínios de fusão ou *"fusion tags*". O uso desses adaptadores pode também auxiliar no processo de purificação das proteínas recombinantes, aumentar a solubilidade e a expressão da proteína, aumentar a eficiência e até prevenir a proteólise do produto expresso (KOSOBOKOVA et al., 2016).

A clonagem no gene em vetor pPICZαA foi confirmada através de sequenciamento do gene, também realizado pela GeneScript[®]. Ao final da expressão em *Pichia pastoris*, os produtos recombinantes obtidos na tradução dos genes serão conforme a representação esquemática da figura 9 abaixo:

Ts8

Ts8

His-tag	EK	Toxina	
 ннннн		 <mark>(</mark> KLVALIPNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPAYEGYCNDHCNDIERKDGI	£
CHGFKC	CKCAKI)	

Ts8-propeptídeo

 His-tag
 EK
 Toxina

 |
 |
 |

 HHHHHHENLYFQGLREKHVQKLVALIPNDQLRSILKAVVHKVAKTQFGCPAYEGYCNDHC

 NDIERKDGECHGFKCKCAKD

Figura 9. Representação esquemática das sequências das proteínas recombinantes traduzidas. As proteínas expressas terão as sequências obtidas acima contendo as regiões de poli-histidina, os sítios de clivagem para as enzimas enteroquinase (EK) e tobacco ech vírus protease (Tev).

4.1.2. Transformação em células de Pichia pastoris

Para que a *P. pastoris* possa dar início à expressão propriamente dita, é necessário que os plasmídeos recombinantes, que contém os genes sintéticos, sejam incorporados à célula hospedeira. Dessa forma, os plasmídeos foram linearizados com a enzima de restrição *PmeI*. No caso, a linearização com a enzima *PmeI* permite que o plasmídeo seja integrado na região promotora AOX1 (CREGG et al., 1985; CEREGHINO e CREGG, 2000). A transformação com os plasmídeos linearizados foi realizada de acordo com o item 3.1.2.

Os vetores, ou plasmídeos, são moléculas de DNA circular de bactérias de diferentes tipos, tamanhos e especificidades, mas que possuem em comum um sítio de clonagem, uma marca seletiva e a origem de replicação. O sítio de clonagem, também chamado de *polylinker*, é o sítio de clivagem das enzimas de restrição onde o fragmento de DNA de interesse, na sua fase de leitura correta (*Open Reading Frame* ou ORF), será adicionado. A marca seletiva são genes que garantem resistência à antibióticos e permitem a seleção dos clones transformados. A origem de replicação, ou ORI, é o sítio onde a replicação do DNA é iniciada (CREGG, 2000).

O vetor utilizado na clonagem foi o pPICZαA da Invitrogen®, representado abaixo (Fig. 10):



Figura 10. Vetor de clonagem/expressão pPICZa. A figura mostra o fragmento AOX 1 (5'AOX) que é a origem de replicação em *E.coli*, o fator de acoplamento alfa (α -fator), a região de sítios múltiplos de clonagem, a cauda de epítopo *myc* (*c*-*myc epitope*), a cauda de 6x histidina, o fator de término da transcrição AOX1 (AOX1TT), o promotor de fator de alongamento da transcrição (Ptef1) e o fator de término de transcrição CYC1 de *S. cerevisae* (CYC1 TT). Fonte:<www.invitrogen.com>.

O vetor pPICZ α possui o gene que confere resistência à zeocina, através do gene *Sh ble* de *Streptoalloteichus hindustanus*. Isso permite a seleção dos clones transformados tanto na clonagem em células de *E. coli* quanto na posterior expressão em *Pichia pastoris*. Além disso, esse vetor possui o α -factor, que é um fragmento que codifica um peptídeo sinal de *Saccharomyces cerevisae*, localizado após o promotor AOX1, permitindo o direcionamento da proteína recombinante através da via secretória da levedura (LAROCHE et al., 1994; HIGGINS e CREGG, 1998; CEREGHINO e CREGG, 2000; CREGG et al., 2000).

As colônias transformadas foram analisadas através de PCR utilizando os oligonucleotídeos 5´da Ts8 e Ts8-propeptídeo, e oligonucleotídeo antissenso 3´AOX do vetor



pPICZαA. No caso da Ts8, 10 colônias transformadas foram escolhidas aleatoriamente, submetidas ao PCR de colônia e analisadas em gel de agarose 1% (Fig. 11):

Figura 11. Perfil eletroforético em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR de colônia das células de *Pichia pastoris* KM71H transformadas com o plasmídeo recombinante contendo o gene da Ts8. Poço 1: MM marcador molecular Gene Ruler 1Kb; Poços 2-11: Colônias transformadas 1, 4, 7, 10, 13, 17, 20, 23, 27 e 30; Poço 12: Controle negativo. As setas indicam as colônias positivas.

Como podemos observar, 4 colônias (10, 13, 23 e 30) foram positivas, ou seja, contêm o vetor com o gene de tamanho esperado para a Ts8 com os adaptadores (aproximadamente 350 pb). Já no caso da Ts8-propeptídeo (aproximadamente 376 pb), 7 colônias foram selecionadas para o PCR, sendo dessas 6 positivas (2, 5, 6, 7, 8 e 9) (Fig. 12).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Figura 12. Perfil eletroforético em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR de colônia das células de *Pichia pastoris* KM71H transformadas com o plasmídeo recombinante contendo o gene da Ts8-propeptídeo. Poço 1: MM marcador molecular Gene Ruler 1Kb; Poço 2: Vazio Poços 3-10: Colônias transformadas 2, 5, 6, 7, 8, 9 e 10; Poço 11: Controle negativo. Poço 12: Vazio. As setas indicam as colônias positivas.

A cepa utilizada para a transformação foi a KM71H. Essa linhagem possui o genótipo arg4 aox1::ARG4 e fenótipo Mut^S, Arg⁺, o que significa que a incorporação do plasmídeo corrompe o gene AOX1, impossibilitando que a enzima álcool oxidase-1 seja expressa. Dessa forma, apenas o gene AOX2 fará a metabolização do metanol através da enzima álcool oxidase-2, permitindo que o crescimento seja lento na presença do metanol. Além disso, o fenótipo Arg⁺ significa que essa cepa tem uma mutação no gene argininosuccinato liase, que previne a estirpe de crescer na ausência de arginina. (DALY e HEARN, 2005).

4.1.3. Triagem da expressão das diferentes colônias em placa em meio BMMY.

As colônias que, de acordo com o PCR, continham o inserto correspondente, foram avaliadas inicialmente através de uma expressão em pequena escala realizada em placa de 26 poços. Nessa expressão a primeira etapa é a geração de biomassa, que permite o crescimento das células, e após 48 h, ocorre a indução da expressão com metanol, de acordo com o item 3.1.3. A indução foi realizada inicialmente com meio BMMY (*Buffered Methanol Complex*)

Medium), conforme recomendado pelo *Easy Select Pichia Expression (Invitrogen*, EUA), com modificações.

A fonte de carbono é um fator fundamental para o sucesso da expressão de proteínas e uma das maiores vantagens do meio BMMY é a suplementação ideal de carbono, já que a *P. pastoris* necessita de uma quantidade ótima do composto para a expressão. Dessa forma, recomenda-se que a expressão inicial seja realizada com esse meio e, caso haja alguma dificuldade na obtenção do produto, recomenda-se que sejam feitas modificações visando a otimização da expressão (XIE et al., 2003).

A primeira etapa de geração da biomassa ocorre através da adição de um meio contendo o glicerol como fonte de carbono, levando a um crescimento rápido das células da *Pichia*. Já na fase de indução, o meio é substituído por outro contendo metanol como fonte de carbono. O metanol induz a expressão da proteína, visto que o plasmídeo recombinante contém o gene AOX regulado pela presença do metanol (CEREGHINO e CREGG, 2000).

Além da adição de metanol e da suplementação de carbono, outro fator fundamental a ser avaliado na triagem é o tempo de expressão. Como o metanol é suplementado a cada 24 h, é necessário que haja uma avaliação da expressão durante vários dias. Uma concentração suficiente de metanol é fundamental para a formação do produto, porém, por outro lado, o metanol é metabolizado a formaldeído gerando peróxido de hidrogênio, que pode ser tóxico para as células e prejudicar a expressão (CREGG et al., 1989).

Para a triagem da expressão, foram coletadas alíquotas nos tempos 0 h, 96 h e 144 h após a indução, e os sobrenadantes foram avaliados por SDS-PAGE utilizando gel a 16% em acrilamida, corado com nitrato de prata. Com relação à Ts8 (Fig. 13), verificou-se que houve a expressão de uma proteína (denominada rTs8) com a massa molecular esperada, e mais duas bandas abaixo dela (menor massa molecular).

Para a rTs8, a massa esperada para a proteína expressa é de 8,13 kDa, sendo 6,7 kDa relacionados à toxina, 840 Da relacionados aos 6 aminoácidos de histidina e 588 Da que corresponde ao sítio de clivagem da enzima enteroquinase.



Figura 13: Perfil representativo da SDS-PAGE da triagem das colônias para expressão da rTs8 em placa de 26 poços. (A) Perfil da SDS-PAGE dos sobrenadantes das culturas no tempo 0 h. Poço 1: Controle negativo; Poços 2 e 3: Marcador de ultra baixa massa molecular; Poços 4 a 7: colônias 10, 20, 23 e 30 respectivamente. (B) Perfil da SDS-PAGE dos sobrenadantes das culturas nos tempos 96 e 144 h. Poço 1: Vazio; Poço 2: Marcador de ultra baixa massa molecular; Poços 3 a 6: colônias 10, 20, 23 e 30 após 96 h de expressão e Poços 7 a 10: colônias 10, 20, 23 e 30 após 144 h de expressão . A seta indica a banda eletroforética correspondente à massa molecular esperada para a rTs8.

No perfil eletroforético apresentado na figura 13 observa-se que as 4 colônias (10, 13, 23 e 30) expressaram a proteína e apresentam proporções semelhantes das bandas protéicas. Dessa forma, selecionamos aleatoriamente a colônia 10 para dar seguimento à expressão em escala preparativa.

Da mesma forma, fizemos a triagem da expressão da Ts8-propeptídeo em placa. A massa esperada para essa toxina é de 9288 Da, sendo 7660 Da correspondente à Ts8-propeptídeo, 840 Da relacionados aos 6 aminoácidos de histidina e 788 Da ao sítio de clivagem da enzima Tev.



Figura 14. Perfil representativo da SDS-PAGE das colônias para expressão da rTs8propeptídeo em placa de 26 poços. (A) Perfil da SDS-PAGE para os sobrenadantes da cultura em tempo 0 h. Poço 1: Vazio; Poços 2: Marcador molecular de ultra baixa massa; Poço 3: Controle negativo; Poços 4 a 9: colônias 2, 5, 6, 7, 8 e 9 respectivamente. Poço 10: Controle positivo. (B) Perfil de SDS-PAGE para os sobrenadantes da cultura em tempos 96 e 144 h. Poço 1: Marcador molecular de ultra baixa massa; Poço 2 a 7: colônias 2, 5, 6, 7, 8 e 9 a 96 h. Poços 8 a 13: 2, 5, 6, 7, 8 e 9 a 144 h e Poços 12: Controle positivo a 144 h. A seta indica a expressão da rTs8-propeptídeo de acordo com a massa correspondente.

No perfil eletroforético apresentado acima (Fig. 14) observa-se que houve a expressão da Ts8-propeptídeo (denominada rTs8-propeptídeo), porém com rendimento menor quando comparado à expressão da rTs8. Pode-se notar também que todas as colônias expressaram a proteína, mas que as colônias 6 e 9 foram as que mostraram o maior rendimento. A colônia 9 foi a escolhida para a expressão em escala preparativa pois essa exibiu, aparentemente, o maior rendimento em 144 h.

Além das toxinas esperadas, outras bandas protéicas foram evidenciadas nos géis de eletroforese. A avaliação e discussão dessas bandas de diferentes massas moleculares são abordadas nos itens subsequentes.

4.1.4. Expressão em escala preparativa com meio BMMY e purificação da rTs8.

Com base nos resultados apresentados acima, foi iniciada a expressão em escala preparativa com a colônia 10 para rTs8. Após a indução da expressão com metanol, foram coletadas alíquotas da expressão a cada 24 h para se avaliar o melhor tempo de expressão da proteína (Fig. 15). A indução foi realizada inicialmente com meio BMMY, conforme recomendado pelo *Easy Select Pichia Expression (Invitrogen*, EUA), com modificações.

Observa-se no perfil eletroforético (Fig.15) que nos tempos 0 e 24 h não houve expressão detectável da rTs8 em escala preparativa, enquanto que a partir de 48 h a expressão manteve-se em um nível semelhante até as 144 h.



Figura 15. Perfil representativo da SDS-PAGE do sobrenadante da expressão em maior escala da colônia 10. Poço 1: Marcador de ultra baixa massa molecular; Poços 2 a 8: Expressão nos tempos 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h respectivamente.

Após 144 h de expressão, o meio de cultura foi centrifugado e o sobrenadante foi então separado e filtrado para a purificação da proteína. Conforme descrito no item anterior, ao gene sintético foram adicionados 6 aminoácidos de histidina no N-terminal de forma que a purificação da proteína fosse facilitada através de uma cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC – *Immobilized-Metal Affinity Chromatography*). Neste estudo, a coluna utilizada foi a que contém resina com níquel imobilizado, N-NTA Agarose (Qiagen) e a eluição do composto se deu à medida que a concentração de imidazol foi elevada.

Com as frações eluídas da cromatografia IMAC foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida conforme o item 3.4.3, para avaliar em qual fração a toxina rTs8 estava presente.



Figura 16. Perfil representativo da SDS-PAGE das frações da cromatografia em coluna IMAC da rTs8. (A) Fração excluída da coluna à fração G1b. Poço 1: Marcador de ultra baixa massa molecular; Poço 2: fração excluída da coluna; Poço 3: lavado; Poço 4: Fração G1a; Poço 5: Fração G1b (10 mM de imidazol); Poço 6: Vazio. (B) Fração G2a à Fração G6c. Poço 1: Vazio; Poço 2: Marcador de ultra baixa massa molecular; Poço 3: Fração G2a; Poço 4: Fração G2b (25 mM de imidazol); Poço 5: Fração G3a; Poço 6: Fração G3b (50 mM de imidazol); Poço 7: Fração G4a; Poço 8: Fração G4b (75 mM de imidazol); Poço 9: Fração G5a; Poço 10: Fração G5b (100 mM de imidazol); Poço 11: Fração G6a; Poço 12: Fração G6b; Poço 13: Fração G6c (250 mM de imidazol); Poço 14: Vazio.

Observa-se que grande parte do produto expresso não interagiu com a resina contida na coluna (Fig. 16). Algumas hipóteses podem explicar este resultado: (1) o componente em questão poderia ser um contaminante da própria *P. pastoris* que não possui a região de polihistidina não permitindo sua interação com a coluna; (2) outra hipótese seria que a rTs8 teria seus aminoácidos de histidina clivados da sequência por alguma protease da *P. pastoris*. (BOLDRINI-FRANÇA, 2013).

Além disso, observa-se que vários compostos tiveram afinidade pela coluna que contém Níquel imobilizado, provavelmente, por apresentarem a sequência de poli-histidina. Estes peptídeos devem ser fragmentos da região N-terminal de rTs8, o que corrobora com a segunda hipótese apresentada acima. A proteína que aparentemente possui a massa molecular esperada para a rTs8 foi eluída com 100% de B (G6c) e aplicada no Poço 13 da SDS-PAGE (Fig 16). Por evidenciar banda eletroforética única, a amostra foi concentrada, eliminando parte do imidazol, e liofilizada. Em seguida foram determinadas sua sequência aminoterminal inicial por degradação de Edman e sua massa molecular por espectrometria de massas.

O sequenciamento amino-terminal dessa fração revelou que o componente se tratava da Ts8 recombinante, porém contaminado por fragmentos da própria Ts8. A espectrometria de massas também indicou que a amostra era heterogênea, visto que apresentou íons com diferentes massas (Fig. 17). Além disso, o espectro revelou que a maior massa obtida estava em torno de 6, kDa, ou seja, diferente do que se esperava para a toxina recombinante, que seria em torno de 8,13 kDa (Fig.17 B). Esses fragmentos são discutidos posteriormente.



Figua 17. Espectros de massas obtidos para a fração eluída com 250 mM de imidazol (**100%B**). Razão massa/carga da fração G6c da cromatografia em IMAC, determinada por MALDI-TOF, modo positivo refletido, matriz DHB. (**A**) Espectro de massa obtido na faixa de 600 a 4000 Da. (**B**) Espectro de massa obtido na faixa de 4000 a 15000 Da.

O composto eluido na fração G5b da IMAC, aplicado no poço 9 do gel de eletroforese (Fig. 16), também foi sequenciado por degradação de Edman, visto que o mesmo apresentava alta afinidade pela resina de Níquel imobilizado e banda eletroforética única. O

sequenciamento revelou que havia um fragmento da rTs8 com apenas nove aminoácidos contaminado com partes de sequência da própria rTs8. Esses nove aminoácidos correspondem à sequência LIPNDQLRS, 5º ao 13º aminoácido da sequência nativa da Ts8. Esses dados confirmam que a rTs8 está sofrendo a ação proteolítica de enzimas da *Pichia pastoris*. Esta enzima deve ter afinidade por sítios de clivagem hidrofóbicos, visto que a primeira clivagem ocorreu entre Ala4 e Leu5 e a segunda entre Ser12 e Ile13 da Ts8.

Uma das maiores desvantagens da expressão em *P. pastoris* é a proteólise de proteínas secretadas, o que pode prejudicar a produção e rendimento das mesmas (SINHA et al., 2004). Os vacúolos dos fungos contêm diversas proteases e os níveis dessas enzimas dependem basicamente das condições nutricionais e da produção de agentes tóxicos que lisam as células, liberando essas enzimas. A *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, já tem várias enzimas proteolíticas bem caracterizadas, como as proteases A e B (prA,prB), amino e carboxipeptidases (VAN DEN HAZEL et al., 1996). Já as proteases de *P. pastoris* ainda não foram bem caracterizadas, mas sabe-se que as cepas KM71 e GS115 contém uma subtilisina, da classe das serinoproteases, além de aminopeptidases, PrA e PrB e que esses organismos possuem proteases ácidas, neutras e básicas (SALAMIN et al., 2010).

A ação proteolítica pode acontecer enquanto a proteína recombinante é transportada através da via secretória por proteases residentes, por proteases extracelulares excretadas ou liberadas no meio através da lise de membrana (WERTEN e DE WOLF, 2005; NI et al., 2008; AHMAD et al., 2014). Grande parte dessas enzimas se encontram em vacúolos, portanto existem alguns fatores que contribuem para sua liberação. Entre eles estão o estresse gerado pela ausência de nutrientes necessários, a mudança da fonte de carbono, o pH inadequado do meio e produção de agentes tóxicos para as células de *P. pastoris* (SINHA et al., 2004).

Sabe-se também que o metanol utilizado na alimentação da cultura contribui para o estresse e liberação de proteases, já que na fase em que as células são alimentadas por glicerol essas enzimas não são encontradas. Durante a fase da indução, são liberadas várias espécies reativas de oxigênio (EROS), peróxido de hidrogênio e formaldeído, que são produtos do metabolismo do metanol. Esses componentes induzem mecanismos de autofagia e lise na cultura de *P. pastoris* (POTVIN et al., 2012).

Existem três principais grupos de proteases em fungos: (1) as proteases presentes nos proteassomas citosólicos, que são peptidases liberadas em condições de estresse e fazem a degradação rápida de peptídeos e proteínas que são prejudiciais para o crescimento celular;

(2) as proteases vacuolares, que são as mais abundantes e são liberadas quando há privação de nutrientes, dentre elas as proteinases A e B, a carboxipeptidase S e Y, entre outras e (3) as proteases de via secretória, das quais fazem parte a *Kex2* peptidase, a dipeptil aminopeptidase, entre outras (ZHANG et al., 2007).

As proteases dos proteassomas citosólicos contam ainda com a proteína chamada ubiquitina. Essa ubiquitina é encontrada em células eucarióticas e desempenham uma importante função de regulação nessas células. Elas sinalizam proteínas que são indesejadas para que sejam degradadas pelo proteassoma (ZHANG et al., 2007).

Apesar disso, a degradação proteolítica é dependente do produto que se pretende expressar, ou seja, algumas proteínas são expressas e mantidas intactas, enquanto outras sofrem proteólise de forma a afetar sua atividade. Essa sensibilidade às proteases depende basicamente da sequência de aminoácidos da proteína expressa, bem como de sua conformação tridimensional, que pode expor sequências suscetíveis à clivagem (POTVIN et al., 2012). Além do mais, proteínas que são danificadas pelo stress oxidativo também podem provocar uma resposta proteolítica (HILT e WOLF, 1992).

No caso da expressão da rTs8 observamos que a proteólise está ocorrendo próximo de aminoácidos hidrofóbicos como Ile e Leu. Nesse caso, a enzima que pode ter participado do processo de proteólise deve ser semelhante à termolisina, uma metaloprotease encontrada em bactérias, já que a mesma cliva preferencialmente locais que possuem aminoácidos volumosos como a Ile e Leu ou aromáticos (KEIL, 1992).

Alguns parâmetros podem ser ajustados no cultivo de *P. pastoris* de modo a minimizar a degradação gerada por proteases. Entre esses fatores estão: mudança de temperatura, alteração do pH do cultivo, adição de inibidores de proteases, mudanças na composição do meio, mudanças na estrutura da proteína, além da utilização de cepas com deficiência de proteases (POTVIN et al., 2012). Todas essas alterações serão discutidas adiante.

4.1.5. Expressão da rTs8 com meio BMMY, PMSF e purificação.

Inicialmente, optou-se por adicionar ao meio de cultivo, o inibidor de serinoprotease PMSF. Esse composto reage com resíduos de serina, inibindo a tripsina, quimiotripsina, trombina e papaína. Como o PMSF não é solúvel em água, optou-se por dissolvê-lo no metanol adicionado ao cultivo a cada 24 h, conforme o item 3.1.5. Além disso, o tempo total
de expressão foi reduzido para 96 h, visando minimizar a ação das proteases sobre o produto expresso.

A expressão da rTs8 com a adição de PMSF foi avaliada por SDS-PAGE (Fig. 18). Verifica-se que boa parte das proteínas expressas permaneceu na fração excluída da IMAC, indicando que não apresentavam a cauda de poli-histidina. Porém, duas bandas proteicas foram evidenciadas nas frações que interagiram com a coluna e eluíram com maiores concentrações de imidazol. Quando comparado com o fracionamento da expressão sem o PMSF (Fig. 16) nota-se que a adição do inibidor não impediu a degradação das toxinas. O composto de maior massa molecular (acima de 6,5 kDa) provavelmente corresponde à rTs8 com menor degradação proteolítica e foi eluído a partir da fração G4a.



Figura 18. Perfil representativo da SDS-PAGE das frações de cromatografia em coluna IMAC da rTs8 expressa com adição de PMSF. (A) Fração excluída da coluna à fração G3a. Poço 1: Vazio; Poço 2: Marcador de ultra baixa massa molecular; Poço 3: Expressão da Ts8 com PMSF por 96 h; Poço 4: Fração excluída da coluna; Poço 5: lavado; Poço 6: Fração G1a; Poço7: Fração G1b (10 mM de imidazol); Poço 8: Fração G2a; Poço 9: Fração G2b (25 mM de imidazol); Poço 10: Fração G3a. (B) Fração G3b à Fração G6c. Poço 1: Vazio; Poço 2: Marcador de ultra baixa massa molecular; Poço 3: Fração G3b (50 mM de imidazol); Poço 4: Fração G4a; Poço 5: Fração G4b (75 mM de imidazol); Poço 6: Fração G5a; Poço 7: Fração G5b (100 mM de imidazol); Poço 8: Fração G6a; Poço 9: Fração G6b; Poço 10: Fração G6c (250 mM de imidazol).

Dessa forma as frações G4a a G6c (poços 4 a 9 da Fig. 18B) foram reunidas, grande parte do imidazol foi eliminado por *desalting* e a amostra foi cromatografia em coluna semipreparativa de fase reversa (Fig. 19).



Figura 19. Perfil representativo da cromatografia em fase reversa das frações G4a a G6c pós *desalting*. A cromatografia foi realizada em sistema *FPLC Äkta Purifier UPC-10* com coluna C18 semipreparativa (250 x 10,0 mm, com partículas de 5 μ m, 300A, Jupiter, Phenomenex), equilibrada com a solução A (TFA 0,1%), sob vazão de 2 mL/min e temperatura de 25°C. A amostra (40 mL) foi inicialmente eluída com solução A, seguindo-se um gradiente de concentração de acetonitrila (solução B – acetonitrila 80% em TFA 0,1%), representado pela linha azul. Volume coletado por tubo: 1 mL.

Picos	Recuperação (%)
2	2,22
3	4,51
4	77,10
5	5,95
6	3,38
7	3,04
8	1,93
9	1,87

Tabela 1. Porcentagem de recuperação da cromatografia em fase reversa das frações G4a a G6c pós *desalting*.

Obs: O pico 1 não foi adicionado à tabela de recuperação pois se trata do imizadol que restou da purificação em resina de níquel, não sendo um componente proteico.

Na cromatografia em fase reversa em coluna semipreparativa (Fig. 19) foram obtidas 10 frações, as quais foram analisadas por uma eletroforese em gel de poliacrilamida (Fig. 20).



Figura 20. Perfil representativo da SDS-PAGE das frações obtidas da cromatografia em fase reversa das frações G4a a G6c. Poço 1: Vazio; Poço 2: Fração 1; Poço 3: Marcador de ultra baixa massa molecular; Poço 4: Fração 2; Poço 5: Fração 3; Poço 6: Fração 4; Poço 7: Fração 5; Poço 8: Fração 6; Poço 9: Fração 7; Poço 10: Fração 8; Poço 11: Fração 9.

De acordo com o gel representado na figura 20, os componentes com a massa molecular esperada para a rTs8 (aproximadamente 8 kDa) se encontram nas frações 8 e 9. Dessa forma, optamos por fazer a clivagem da fração 8 com a enzima enteroquinase, para remoção da região de poli-histidina e posteriores ensaios. A clivagem da fração 9 também foi realizada e o perfil obtido foi semelhante ao do pico 8 (dados não mostrados). Optamos em apresentar o perfil do pico 8 pois deste pico foi obtida a fração do ensaio de eletrofisiologia e este também foi o pico avaliado em outros ensaios funcionais (resultados apresentados adiante).

A porcentagem de recuperação das frações obtidas na cromatografia em fase reversa (Tab. 1) mostra que os compostos de maior massa molecular exibem uma baixa recuperação (3,04%, 1,93% e 1,87%, para as frações 7, 8 e 9, respectivamente). Ou seja, mesmo adicionando o PMSF no meio de cultura, grande parte da rTs8 continuou sofrendo degradação proteolítica. Isso se deve ao fato de que provavelmente existem outras proteases além das serinoproteases atuando na degradação do produto expresso.

A próxima etapa para a obtenção da toxina semelhante à nativa foi a clivagem da região de poli-histidina. Foi então realizada a reação da fração 8 (Fig. 18) com a enzima enteroquinase conforme descrito no item 3.2. Após a clivagem, o produto da reação foi

submetido a uma cromatografia de fase reversa em coluna C18 para peptídeos (250 x 2,1 mm, com partículas de 5 µm, Vydac, Grace), para a purificação do composto de interesse (Fig. 21). Essa coluna foi escolhida para esta cromatografia, pois contêm partículas menores na sua resina, o que permite uma boa resolução na separação de peptídeos.



Figura 21. Perfil representativo da cromatografia em fase reversa do produto da clivagem da região de poli-histidina da fração 8. A cromatografia foi realizada em sistema *FPLC Äkta Purifier UPC-10* com coluna C18 para peptídeos, equilibrada com a solução A (TFA 0,1%), sob vazão de 0,3 mL/min e temperatura de 25°C. A amostra (1 mL) foi inicialmente eluída com solução A, seguindo-se um gradiente de concentração de acetonitrila (solução B – acetonitrila 80% em TFA 0,1%), representado pela linha azul. Volume coletado por tubo: 0,3 mL.

A fração 1 da figura 21 foi sequenciada por degradação de Edman e demonstrou ser a região de poli-histidina contaminada com partes da rTs8. Já a fração 5 foi submetida a espectrometria de massas que revelou uma massa de 1380,54 kDa e outra de 5358,83 (Fig. 22).



Figura 22. Espectro de massas obtido da fração 5 da cromatografia de fase reversa demonstrado no perfil da figura 21. Foi utilizado o espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF. O espectro foi adquirido no modo positivo linear em matriz DHB. Espectro obtido na faixa de 1000 a 10000 Da.

A rTs8 sem a região de poli-histidina e sem o sítio de clivagem da enteroquinase, possui 6722 Da (Ts8 nativa). A massa de 1380 Da obtida no espectro acima corresponde a uma parte da região N-terminal da Ts8 sem a região de poli-histidina, que seria do primeiro ao 12º aminoácido (KLVALIPNDQLR). A segunda massa de 5358 Da corresponde ao restante da toxina, do 13º ao 60º aminoácido: (SILKAVVHKVAKTQFGCPAYEGYCNDHCNDIER RKDGECHGFKCKCAKD).

Este fragmento do 13° ao 60° aminoácido apresenta as seis cisteínas da molécula e, provavelmente, mantém o enovelamento normal da Ts8, com as 3 pontes dissulfeto. Essa clivagem no 12° resíduo da toxina pode ter sido originada antes da reação com a enteroquinase (clivagem por proteases da *P. pastoris*) ou pode ter sido uma clivagem inespecífica da enteroquinase, já que essa enzima cliva especificamente a região Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (DDDDK) após a lisina, mas pode clivar outros aminoácidos básicos dependendo da conformação da proteína.

A região de poli-histidina foi clivada com sucesso pela enteroquinase e a rTs8 presente nessa amostra continha tanto a parte N-terminal e a C-terminal na toxina. Com essa amostra foi realizada a eletrofisiologia em oócitos de *Xenopus laevis* pela técnica de *voltage clamp*, e os resultados obtidos serão apresentados posteriormente.

4.1.6. Expressão em escala preparativa em meio BMMY e purificação da rTs8-propeptídeo.

Assim como a rTs8, a expressão em escala preparativa da rTs8-propeptídeo foi inicialmente realizada de acordo com o protocolo sugerido pelo no manual *Easy Select Pichia Expression (Invitrogen*, EUA). A cada 24 h de expressão, as alíquotas foram coletadas e centrifugadas para avaliação por SDS-PAGE (Fig. 23).



Figura 23. Perfil representativo da SDS-PAGE da expressão em maior escala da colônia 9 da rTs8-propeptideo. Poço 1: Marcador de ultra baixa massa molecular; Poços 2 a 8: Expressão nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 144 h respectivamente.

Observa-se pelo perfil eletroforético dos sobrenadantes das culturas (Fig. 23) que a expressão da rTs8-propeptídeo se iniciou após 24 h e foi aumentando gradativamente com o tempo. Apesar disso, nota-se que o rendimento foi bem inferior quando comparado com a expressão da rTs8 (Fig. 15).

Ao gene sintético da rTs8-propeptídeo também foram adicionados os aminoácidos de histidina para a posterior purificação for afinidade em resina contendo Níquel imobilizado (IMAC). No entanto, observa-se que o composto expresso não interagiu com a coluna (Fig. 24), ficando na fração excluída da coluna na cromatografia de afinidade (IMAC). Como

discutido anteriormente, provavelmente a região de poli-histidina foi clivada por enzimas da *P. pastoris*, impedindo sua interação com a resina da coluna.



Figura 24. Perfil representativo da SDS-PAGE das frações da cromatografia em coluna IMAC da rTs8-propeptideo expressa em meio BMMY. (A) Fração excluída da coluna à fração G1b. Poço 1: Marcador de ultra baixa massa molecular; Poço 2: Fração excluída da coluna; Poço 3: lavado; Poço 4: Fração G1a; Poço 5: Fração G1b (10 mM de imidazol); Poço 6: Vazio. (B) Fração G2a à Fração G6c. Poço 1: Vazio; Poço 2: Marcador de ultra baixa massa molecular; Poço 3: Fração G2a; Poço 4: Fração G2b (25 mM de imidazol); Poço 5: Fração G3a; Poço 6: Fração G3b (50 mM de imidazol); Poço 7: Fração G4a; Poço 8: Fração G4b (75 mM de imidazol); Poço 9: Fração G5a; Poço 10: Fração G5b (100 mM de imidazol); Poço 11: Fração G6a; Poço 12: Fração G6b; Poço 13: G6c (250 mM de imidazol); Poço 14: Vazio.

Outras neurotoxinas produzidas em nosso laboratório não tiveram ação de proteases sobre os produtos recombinantes (AMORIM, 2015; BOLDRINI-FRANÇA, 2015). Isso corrobora para o fato de que essas duas toxinas especificamente possuem propriedades que as tornam mais suscetíveis à ação proteolítica. Como citado anteriormente, algumas proteínas quando secretadas, podem sofrer rapidamente ação proteolítica, quando esses compostos são danosos para as células de *P.pastoris*.

As β -KTxs, classe em que a Ts8 e Ts8-propeptideo ou *scorpine-like* possuem um Nterminal que se move livremente, ou seja, um N-terminal exposto, o que é um fator que pode contribuir para a clivagem das proteínas produzidas (DIEGO-GARCIA et al., 2008). Além disso, essas duas toxinas e toxinas semelhantes a elas são podem apresentar propriedades citolíticas e antimicrobianas, o que pode estar causando toxicidade do produto recombinante para as células de *P. pastoris*, contribuindo para a ação proteolítica na expressão deste composto (CONDE et al., 2000).

A região N-terminal é semelhante tanto na rTs8 quanto na rTs8-propeptídeo, porém a Ts8-propeptídeo possui uma cadeia maior de aminoácidos nessa região, o que pode explicar a o perfil diferente de clivagem no N-terminal e a falta de interação com a coluna. Além disso, a Ts8-propeptídeo é uma molécula que tem a ação *scorpine-like*, ou seja, tem maior atividade antimicrobiana, quando comparada com a Ts8, podendo justificar o fato de sua expressão ter um rendimento menor do que a rTs8 (MARTIN-EAUCLAIRE et al., 2016).

Outro fato observado na expressão dessas toxinas é que os géis de eletroforese desde o início da triagem e expressão possuem como característica inúmeras bandas eletroforéticas, fato que não é observado na expressão de outras toxinas em nosso laboratório. Esse comportamento pode ser devido à lise celular, que libera componentes proteicos do próprio organismo, que permanecem no sobrenadante mesmo após a centrifugação e podem ser observados nos géis de expressão.

4.1.7. Avaliação da expressão da rTS8 e rTs8-propeptídeo com adição de casaminoácidos e meio mínimo.

Como citado anteriormente, alguns parâmetros podem ser ajustados de forma a minimizar a degradação proteolítica dos produtos recombinantes. Apesar do PMSF ter contribuído para reduzir a degradação da rTs8, optou-se por realizar uma avaliação do processo de expressão em placas de 26 poços.

Inicialmente foram selecionados os parâmetros relacionados ao meio de cultura para serem ajustados. Sabe-se que alterações na composição dos meios de cultura podem minimizar a degradação proteolítica. Um exemplo é a alteração do pH do meio, que pode influenciar na expressão de proteases endógenas (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

A *P. pastoris* pode sobreviver em uma faixa de pH de 3,0 a 7,0, o que permite que o pH seja ajustado de forma a minimizar a degradação proteolítica. Sinha et al. (2004) observaram que o pH 5,0 aumentou a resposta proteolítica ao Interferon-T recombinante, enquanto que em pH 6,0 a degradação desse produto foi reduzida significativamente. Já o produto recombinante rHSA, em pH 5,6 não sofreu ação de proteases, enquanto que em pH 4,3 as proteases endógenas reduziram pela metade a produção da proteína recombinante (KOBAYASHI et al., 2000).

Boldrini-França et al. (2015) observaram que em pH 7,0 a serinoprotease recombinante da serpente *Crotalus durissus collilineatus* teve um rendimento muito elevado, quando comparado ao pH 4,0.

A expressão inicial da rTs8 e da rTs8-propeptideo foi realizada em pH 6,0. No manual no manual *Easy Select Pichia Expression (Invitrogen*, EUA) é sugerido que quando o produto recombinante sofre ação proteolítica, o meio seja modificado para um meio mínimo (MMH), que faz com que o pH diminua para 3 ou menos, o que pode inativar proteases com pH ótimo perto do neutro.

Além da modificação do pH do meio, sabe-se que a adição de suplementos no cultivo pode aumentar o rendimento do produto expresso e diminuir a atividade das proteases (MACAULEY-PATRICK et al., 2005; AYED et al., 2008). Entre esses suplementos se encontram os casaminoácidos (CA), que nada mais são do que uma mistura de aminoácidos e pequenos peptídeos resultantes da hidrólise ácida da caseína. A adição de casaminoácidos demonstrou-se eficiente na produção de diversas proteínas em *P. pastoris*, como no caso do Interferon-T, em que a adição de 5 g/L de casaminoácidos reduziu a proteólise do produto (SINHA et al., 2004), assim como na produção de fragmento de anticorpo anti-LDL scFv , onde a adição de 10 g/L desse substrato minimizou a proteólise (FEITOSA, 2014).

Sabe-se que os casaminoácidos inibem a degradação proteolítica pois competem com o produto expresso pelo sítio responsável pela atividade enzimática e são utilizadas concentrações de 3 a 30 g/L. O manual *Easy Select Pichia Expression (Invitrogen*, EUA) sugere que sejam adicionados casaminoácidos a 1%. Dessa forma, foram escolhidas 4 concentrações (2,5 a 20 g/L) de casaminoácidos e adicionadas ao meio BMMY (FEITOSA, 2014; ZHANG, 2006).

Inicialmente foi realizada a triagem da rTs8 com o MMH e suplementação de casaminoácidos. Foram coletadas alíquotas da expressão a cada 24 h e avaliadas por SDS-PAGE. Observa-se que a adição de casaminoácidos minimizou a proteólise do produto recombinante em 24 h de expressão (Fig. 25A). Porém, a partir de 48 h a rTs8 foi degradada assemelhando-se à expressão normal, sem a adição do composto (Fig. 25B a 25F).

Já com o meio mínimo (MMH), observa-se que houve uma diminuição considerável do rendimento do produto expresso e que esta condição (meio mínimo) não foi capaz de reduzir a atividade proteolítica sobre o produto a partir de 48 h de expressão.



Figura 25. Perfis representativos de SDS-PAGEs para avaliação da expressão da rTs8 com adição de casaminoácidos. (A) tempo 24 h (B) tempo 48 h (C) tempo 72 h (D) tempo 96 h (E) tempo 120 h e (F) tempo 144 h. Aos poços foram adicionados respectivamente: Marcador de ultra baixa massa molecular; Controle negativo do meio de cultura; Controle negativo da expressão; Expressão padrão com meio BMMY; Expressão com meio MMH; Expressão com meio BMMY+CA 2,5 g/L; Expressão com meio BMMY+CA 5 g/L; Expressão com meio BMMY+CA 20 g/L. Observação: todos os géis seguiram essa ordem de amostras aplicadas nos poços.

O mesmo experimento foi realizado com a rTs8-propeptideo (Fig. 26). Observa-se que o rendimento aumentou consideravelmente quando comparado à expressão inicial sem os casaminoácidos. Além disso, na expressão em 24 h, não houve formação de produto de degradação proteolítica. Após 24 h já se observa proteólise do produto recombinante.



Figura 26. Perfis representativos de SDS-PAGEs para avaliação da expressão da Ts8propeptideo com adição de casaminoácidos. (A) tempo 24 h (B) tempo 48 h (C) tempo 72 h (D) tempo 96 h (E) tempo 120 h e (F) tempo 144 h. Aos poços foram adicionados respectivamente: Marcador de ultra baixa massa molecular; Controle negativo do meio de cultura; Controle negativo da expressão; Expressão com meio BMMY; Expressão com meio MMH; Expressão com meio BMMY+CA 2,5 g/L; Expressão com meio BMMY+CA 5 g/L; Expressão com meio BMMY+CA 10 g/L e expressão com meio BMMY+CA 20 g/L. Observação: todos os géis seguiram essa ordem de amostras aplicadas nos poços.

4.1.8. Avaliação da expressão da rTs8 e rTs8-propeptídeo com inibidores de proteases.

Além da avaliação da expressão com modificações no meio de expressão, também foram avaliadas as expressões da rTs8 e rTs8-propeptideo na presença de inibidores de protease (Fig. 27). Esses inibidores são coquetéis vendidos comercialmente que abrangem um amplo espectro de enzimas. No caso, o coquetel adicionado ao meio possui os seguintes compostos: (1) AEBSF-[4-(2-Aminoetil) benzenosulfonil fluorido hidrocloreto], que é um inibidor de serinoproteases como a tripsina, quimiotripsina, plasmina, calicreína e trombina; (2) hidrocloreto de bestatina, que é inibidor de aminopeptidases; (3) Leupeptina, que é inibidor de serino e cisteinoproteases; (4) E-64-[N-(trans-Epoxysuccinil)-L-leucina4-guanidinobutilamida], que é inibidor de cisteinoproteases; (5) Aprotinina, que é inibidor de serinoproteases; (6) Pepstatina A, que é inibidor de proteases ácidas e (7) sal dissódico de fosforamidon, que é inibidor de termolisina e colagenases.

Com isso, visou-se abranger várias proteases que poderiam estar atuando na expressão. Sinha et al. (2004) adicionaram ao sobrenadante da fermentação de seu produto, PMSF (1mM) e EDTA (1mM) e observaram que a atividade proteolítica foi reduzida em 94.2% quando esses dois inibidores foram adicionados em conjunto. Já uma concentração maior de PMSF levou à formação de precipitado. Quando adicionaram outros inibidores como a Pepstatina e o E-64, os autores notaram que a combinação de Pepstatina e PMSF preveniu ainda mais a degradação do produto. Eles concluíram então que a ação proteolítica sobre o Interferon-T estava ocorrendo devido à uma combinação de proteases.

SHI et al. (2003) conseguiram reduzir 53% da atividade de proteases com a adição de inibidores de serinoproteases e 30% com a adição de inibidores de proteases aspárticas.

No caso da expressão da rTs8 observou-se que a expressão com PMSF não reduziu a degradação proteolítica. A adição de EDTA seria prejudicial para a purificação do produto, já que é um agente quelante, que pode se ligar à resina com níquel imobilizado prejudicando a posterior purificação.



Figura 27. Perfis representativos de SDS PAGEs da avaliação da expressão da Ts8 e Ts8- propeptídeo com inibidores de proteases. (A) tempo 24 h (**B**) tempo 48 h (**C**) tempo 72 h (**D**) tempo 96 h (**E**) tempo 120 h e (**F**) tempo 144 h. Aos poços foram adicionados na sequência: Marcador de ultra baixa massa molecular; Controle negativo do meio de cultura; Controle negativo da expressão; Expressão da Ts8 com meio BMMY; Expressão da Ts8 com meio BMMY+PMSF; Expressão da Ts8 com meio BMMY+ inibidores de protease; Expressão da Ts8 com meio BMMY+CA 2,5 g/L+ inibidores de protease; Expressão da Ts8-propeptideo com meio BMMY; Expressão da Ts8-propeptideo com meio BMMY+PMSF; Expressão da Ts8-propeptideo com meio BMMY+CA 2,5 g/L+ inibidores de protease e expressão da Ts8-propeptideo com meio BMMY+CA 2,5 g/L+ inibidores de protease e expressão da Ts8-propeptideo com meio BMMY+CA 2,5 g/L+ inibidores de protease e expressão da Ts8-propeptideo com meio BMMY+CA 2,5 g/L+ inibidores de protease e expressão da Ts8-propeptideo com meio BMMY+CA 2,5 g/L+ inibidores de protease e expressão da Ts8-propeptideo com meio BMMY+CA 2,5 g/L+ inibidores de protease e expressão da Ts8-propeptideo com meio BMMY+CA 2,5 g/L+ inibidores de protease e expressão da Ts8-propeptideo com meio BMMY+CA 2,5 g/L+ inibidores de protease e expressão da Ts8-propeptideo com meio BMMY+CA 2,5 g/L+ inibidores de protease e expressão da Ts8-propeptideo com meio BMMY+CA 2,5 g/L+ inibidores de protease e expressão da Ts8-propeptideo com meio BMMY+CA 2,5 g/L+ inibidores de protease e expressão com se géis seguiram essa ordem de amostras aplicadas nos poços.

Os perfis eletroforéticos apresentados na figura 27 acima mostra que a adição de inibidores de proteases foi favorável na expressão da rTs8 em 24 h, visto que o produto de degradação da toxina (banda abaixo de 6,5 kDa) não foi evidenciado. Já nos outros tempos de expressão observa-se que a banda proteica correspondente ao fragmento da rTs8 foi evidenciada, indicando que os inibidores de protease adicionados ao meio não foram suficientes para inibir a degradação do produto. Além disso, observa-se que a expressão com casaminoácidos e inibidores foi semelhante à aquela que continha apenas casaminoácidos. Dessa forma optou-se por adicionar apenas casaminoácidos ao meio, já que a adição de inibidores na expressão em maior escala não é viável, visto que o mesmo teria que ser adicionado em um volume considerado grande, o que alteraria muito o volume de expressão.

Com relação à rTs8-propeptídeo, a adição de inibidores não foi suficiente para inibir a formação do produto de degradação mesmo em 24 h de expressão. Dessa forma, combinando os resultados de mudança de meio de cultura e adição de inibidores optou-se por realizar as próximas expressões em 24 h, tanto nas expressões da rTs8 quanto na rTs8-propeptídeo, e adicionar apenas os casaminoácidos 2,5 g/L ao meio.

4.1.9. Avaliação da expressão da rTs8 e rTs8-propeptídeo com diminuição da temperatura

A diminuição da temperatura de cultivo pode influenciar no rendimento da expressão em *P. pastoris*, visto que temperaturas altas podem afetar a estabilidade da proteína bem como liberar mais proteases no cultivo e alterar o enovelamento das mesmas (HONG et al., 2002).

Hong et al (2002) diminuíram a temperatura da expressão da laccase, uma enzima encontrada em plantas e fungos, de 30°C para 20°C e obtiveram um aumento da atividade enzimática. Os autores sugerem que a diminuição da temperatura foi vantajosa pois a atividade de enzima diminui à medida que a temperatura aumenta, mas também sugerem que a expressão da laccase a 20°C apresentou menos bandas de produto de degradação proteolítica.

Assim, optou-se por avaliar a expressão da Ts8 e da Ts8-propeptídeo diminuindo a temperatura de 30°C para 20°C. A cada 24 h, foi retirada uma alíquota do meio de cultivo para avaliar a expressão por SDS-PAGE. Os perfis dos géis de eletroforese dessas alíquotas estão representados na figura 28.



Figura 28. Perfis de SDS-PAGEs da avaliação da expressão da Ts8 e Ts8-propeptídeo com diminuição da temperatura para 20°C. (A) Expressão da Ts8 de 24 a 144 h. Poço 1: Vazio; Poço 2: Marcador de ultra baixa massa molecular; Poço 3: Controle negativo do meio de cultura; Poço 4: Controle negativo da expressão; Poço 5: Expressão a 0 h; Poço 6: Expressão a 24 h; Poço 7: Expressão a 48 h; Poço 8: Expressão a 72 h; Poço 9: Expressão a 96 h; Poço 10: Expressão a 120 h; Poço 11: Expressão a 144 h e Poço 12: Vazio. (B) Expressão da Ts8-propeptídeo de 24 a 144 h. Poço 1: Vazio; Poço 2: Marcador molecular de ultra baixa massa; Poço 3: Controle negativo da expressão; Poço 4: Controle negativo do meio de cultura; Poço 5: Expressão a 0 h; Poço 6: Expressão a 24 h; Poço 5: Expressão a 0 h; Poço 6: Expressão a 24 h; Poço 5: Expressão a 0 h; Poço 6: Expressão a 24 h; Poço 5: Expressão a 0 h; Poço 6: Expressão a 24 h; Poço 7: Expressão a 48 h; Poço 8: Expressão a 120 h; Poço 11: Vazio; Poço 7: Expressão a 48 h; Poço 8: Expressão a 120 h; Poço 11: Vazio; Poço 12: Vazio do meio de cultura; Poço 5: Expressão a 0 h; Poço 6: Expressão a 24 h; Poço 7: Expressão a 48 h; Poço 8: Expressão a 120 h; Poço 9: Expressão a 120 h; Poço 11: Expressão a 144 h e Poço 12: Vazio.

Os perfis eletroforéticos mostram que a diminuição da temperatura não foi suficiente para minimizar a formação do produto da proteólise tanto da Ts8 quanto da Ts8-propeptídeo. Observa-se que as bandas referentes ao produto de degradação (abaixo de 6,5 kDa) já são observadas após 48 h na expressão da Ts8 e após 24 h na expressão da Ts8-propeptídeo.

Jahic et al (2003) obtiveram uma concentração muito maior de uma proteína da *Candida antarctica* expressa em *P. pastoris* quando diminuíram a temperatura da expressão de 30 para 22°C. Por outro lado, Inan et al (1999) não observaram diferença significativa na expressão de um peptídeo anticoagulante do *Ancylostoma caninum* em *P. pastoris* ao diminuírem a temperatura de 30 para 22°C.

Embora muitos trabalhos indiquem que a diminuição da temperatura pode ser benéfica na expressão de proteínas em *P. pastoris* (MACAULEY-PATRICK et al., 2005; SIREN et al., 2006), tudo indica que existem produtos de expressão que são mais suscetíveis aos efeitos de proteases do que outros.

No caso da Ts8 e da Ts8-propeptídeo, as mesmas sofrem degradação proteolítica na própria glândula do veneno e dão origem a diversos peptídeos. Sabe-se até o momento, que a

peçonha de *T. serrulatus* é constituída de mais de 300 toxinas e que mais de centena delas ainda não foram identificadas, sendo que grande parte são produtos de degradação das próprias toxinas (PIMENTA et al., 2001).

Verano-Braga et al (2013) detectaram diversos fragmentos de neurotoxinas na peçonha de *T. serrulatus*, entre elas, fragmentos da Ts8-propeptídeo e observaram que essas toxinas sofrem processamentos proteolíticos através de proteases da própria peçonha. Martin-Eauclaire et al (1994) através da biblioteca de *T, serrulatus*, já tinham observado que toxinas de *Tityus* que contêm a sequência Gly-Lys-Lys no C-terminal eram clivadas por carboxipeptidases, fato que foi confirmado descrito posteriormente por outros autores (PIMENTA et al., 2001).

Pouco se sabe sobre a relevância desse processamento proteolítico na peçonha de *T. serrulatus*, mas sugere-se que ele aumenta o repertório de toxinas, gerando diferentes fragmentos com diferentes ações (VERANO-BRAGA et al., 2013).

Carmo et al (2014) identificaram diversas metaloproteases na peçonha de *T. serrulatus*, que foram denominadas de metalloserrulases. Algumas destas enzimas têm como sítio de clivagem as regiões próximas a resíduos básicos como K (lisina) e R (arginina). A Ts8 e a Ts8-propeptídeo possuem diversas lisinas e argininas em sua cadeia de aminoácidos, tornando-as mais suscetíveis ao processamento proteolítico na peçonha, bem como na expressão heteróloga em *P. pastoris*.

4.1.10. Expressão em escala preparativa da rTs8 com adição de casaminoácidos.

A expressão em escala preparativa com adição de 2,5 g/L de casaminoácidos foi realizada por apenas 24 h. Após esse tempo, a cultura foi centrifugada e o sobrenadante submetido à IMAC, como realizado nas expressões anteriores. Das frações eluídas foi coletada uma alíquota e realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida (Fig. 29).



Figura 29. Perfis representativos das SDS-PAGEs das frações da cromatografia em coluna IMAC da rTs8 expressa com adição de casaminoácidos. (A) Expressão, fração excluída da coluna à fração G3a. Poço 1: Vazio; Poço 2: Marcador de ultra baixa massa molecular; Poço 3: Expressão da Ts8 com casaminoácidos em 24 h; Poço 4: fração excluída da coluna; Poço 5: lavado; Poço 6: Fração G1a; Poço7: Fração G1b (10 mM de imidazol); Poço 8: Fração G2a; Poço 9: Fração G2b (25 mM de imidazol); Poço 10: Fração G3a. (B) Fração G3b à Fração G6c. Poço 1: Vazio; Poço 2: Marcador de ultra baixa massa molecular; Poço 3: Fração G6c. Poço 1: Vazio; Poço 2: Marcador de ultra baixa massa molecular; Poço 3: Fração G6c. Poço 1: Vazio; Poço 2: Marcador de ultra baixa massa molecular; Poço 3: Fração G6c. Poço 1: Vazio; Poço 4: Fração G4a; Poço 5: Fração G3a. (B) Fração G3b à Fração G6c. Poço 1: Vazio; Poço 4: Fração G4a; Poço 5: Fração G4b (75 mM de imidazol); Poço 6: Fração G5a; Poço 7: Fração G5b (100 mM de imidazol); Poço 8: Fração G6a; Poço 9: Fração G5a; Poço 10: Fração G5b (100 mM de imidazol); Poço 8: Fração G6a; Poço 9: Fração G6b; Poço 10: Fração G6c (250 mM de imidazol).

Como pode ser observado no poço 3 do primeiro gel (Fig. 29A), na expressão em escala preparativa, diferentemente da triagem com o casaminoácido, já em 24 h observa-se a formação dos produtos de degradação da rTs8. Além disso, o rendimento foi bem inferior quando comparado à expressão de 96 h. Porém, a proporção do componente de menor massa (produto de degradação) é bem menor quando comparado ao da figura 17. Isso também pode ser observado no rendimento da cromatografia realizada com essas frações (Fig. 30).



Figura 30. Perfil representativo da cromatografia em fase reversa das frações G3a a G6c pós *desalting*. A cromatografia foi realizada em sistema *FPLC Äkta Purifier UPC-10* com coluna C18 semipreparativa (250 x 10,0 mm, com partículas de 5 μ m, 300A, Jupiter, Phenomenex), equilibrada com a solução A (TFA 0,1%), sob vazão de 2 mL/min e temperatura de 25°C. A amostra (40 mL) foi inicialmente eluída com solução A, seguindo-se um gradiente de concentração de acetonitrila (solução B – acetonitrila 80% em TFA 0,1%), representado pela linha azul. Volume coletado por tubo: 1 mL.

Picos	Recuperação (%)
2	2,11
3	6,38
4	57,99
5	5,27
6	5,56
7	2,74
8	14,85
9	5,10

 Tabela 2. Porcentagem de recuperação da cromatografia em fase reversa das frações

 G3b a G6c pós *desalting* da expressão com casaminoácidos.

Obs: O pico 1 não foi adicionado à tabela de recuperação pois se trata do imizadol que restou da purificação em resina de níquel, não sendo um componente proteico.

Quando se compara as recuperações das frações apresentadas na tabela 2, correspondentes à expressão realizada na presença de casaminoácidos, com as da tabela 1, correspondentes à expressão com a adição de PMSF apenas, observa-se que a porcentagem de recuperação do pico 4 diminui e a do pico 8 aumenta. Isso significa que houve uma diminuição da ação proteolítica do composto de massa molecular maior (pico 8), já que houve um aumento da sua porcentagem, enquanto que o composto 4 (principal produto da ação proteolítica) diminui. Dessa forma, embora a adição de casaminoácidos não seja suficiente para eliminar a degradação do produto expresso, ficou evidente que esse substrato minimiza a degradação proteolítica.

Foram realizadas as espectrometrias de massas dos picos, 2 a 9 (Fig. 31 a 33). Observa-se que as frações contêm, em sua maioria, regiões de N-terminal da rTs8 clivadas. Os fragmentos que foram identificados foram colocados em negritos e seus aminoácidos correspondentes adicionados aos espectros para melhor visualização.



Figura 31. Espectros de massas dos picos 2, 3 e 4 em MALDI-TOF modo linear positivo. (A) Espectro do pico 2 obtido na faixa de 1000 a 5000 Da em matriz DHB. (B) Espectro do pico 3 obtido na faixa de 1000 a 10000 Da em matriz DHB. (C) Espectro de massas do pico 4 obtido na faixa de 1000 a 5000 Da em matriz SA.



Figura 32. Espectros de massas dos picos 5, 6 e 7 em MALDI-TOF modo linear positivo. (A) Espectro do pico 5 obtido na faixa de 1000 a 5000 Da em matriz DHB. (B) Espectro do pico 6 obtido na faixa de 4000 a 10000 Da em matriz DHB. (C) Espectro de massas do pico 7 obtido na faixa de 1000 a 10000 Da em matriz SA.



Figura 33. Espectros de massas dos picos 8 e 9 em MALDI-TOF modo linear positivo. (A) Espectro do pico 8 obtido na faixa de 4000 a 10000 Da em matriz DHB. (B) Espectro do pico 9 obtido na faixa de 1000 Da em matriz DHB.

Observa-se que os fragmentos obtidos na expressão da rTs8 em *P. pastoris* possuem alguns aminoácidos preferenciais no produto de clivagem. A maioria dos fragmentos foram obtidos pela clivagem próxima de aminoácidos hidrofóbicos como a Leu (leucina), Val (valina) e básicos como a Arg (arginina), Lys (lisina) e Hys (histidina).

Já é descrito que a *P. pastoris* produz diferentes tipos de proteases no meio. Entre elas estão as subtilisinas, que são a segunda maior classe de serinoproteases e são ativadas em pH alcalino ou neutro e cliva preferencialmente resíduos hidrofóbicos (SIEZEN e LEUNISSEN, 1997). Essa enzima já foi encontrada na cepa KM71, que é a mesma cepa presente nesse trabalho (SALAMIN et al., 2010). Dessa forma, possivelmente as subtilisinas são enzimas

que participam das clivagens da rTs8 e da rTs8-propeptídeo, já que várias clivagens próximas a aminoácidos hidrofóbicos foram identificadas.

Além disso, enzimas do tipo tripsina, que também são serinoproteases, clivam proteínas próximo a resíduos básicos, como K (lisina) ou R (arginina) (PERONA e CRAIK, 1997). Esse padrão também pode ser observado nas clivagens da rTs8 (Fig. 31B, C e Fig 32A).

Não foi observada clivagem na região C-terminal da rTs8. Isso se deve provavelmente à estrutura da proteína, que por possuírem cisteínas nessa região, fazem pontes dissulfeto e se tornam mais enoveladas e compactas, o que dificulta a ação das proteases. Já o N-terminal, como já descrito anteriormente, fica livre na molécula e se torna mais suscetível a essas enzimas (DIEGO-GARCIA et al., 2008).

4.1.11. Expressão em escala preparativa da rTs8-propeptídeo com adição de casaminoácidos.

Assim como na expressão da rTs8, a suplementação de casaminoácidos também foi realizada na expressão da rTs8-propeptídeo e a expressão aconteceu também em 24 h (Fig. 34).

Na expressão inicial (apenas em meio BMMY), nenhum composto interagiu com a coluna de afinidade. Já com a adição de casaminoácidos, pode-se notar que houve interação de um composto com a coluna apesar de estar acima da massa esperada para esse produto recombinante.



Figura 34. Perfil representativo da SDS-PAGE das frações da cromatografia em coluna IMAC da rTs8-propeptideo expressa com adição de casaminoácidos ao meio. (A) Fração excluída da coluna à fração G1b. Poço 1: Marcador de ultra baixa massa molecular; Poço 2: Fração excluída da coluna; Poço 3: lavado; Poço 4: Fração G1a; Poço 5: Fração G1b (10 mM de imidazol); Poço 6: Vazio. (B) Fração G2a à Fração G6c. Poço 1: Vazio; Poço 2: Marcador de ultra baixa massa molecular; Poço 3: Fração G2a; Poço 4: Fração G2b (25 mM de imidazol); Poço 5: Fração G3a; Poço 6: Fração G3b (50 mM de imidazol); Poço 7: Fração G4a; Poço 8: Fração G5a; Poço 10: Fração G5b (100 mM de imidazol); Poço 11: Fração G6a; Poço 12: Fração G6b; Poço 13: G6c (250 mM de imidazol); Poço 14: Vazio.

As frações eluídas da IMAC foram concentradas, foi realizado o *desalting* e o material retido também foi submetido a uma cromatografia em fase reversa em coluna semi preparativa (Fig. 35).



Figura 35. Perfil representativo da cromatografia em fase reversa das frações G1a a G3a pós *desalting*. A cromatografia foi realizada em sistema *FPLC Äkta Purifier UPC-10* com coluna C18 Semipreparativa (250 x 10,0 mm, com partículas de 5 μ m, 300A, Jupiter, Phenomenex), equilibrada com a Solução A (TFA 0,1%), sob vazão de 2 mL/min e temperatura de 25°C. A amostra (40 mL) foi inicialmente eluída com solução A, seguindo-se um gradiente de concentração de acetonitrila (solução B – acetonitrila 80% em TFA 0,1%), representado pela linha azul. Volume coletado por tubo: 1 mL.



Figura 36. Espectro de massas do pico 3 do perfil da figura 34 em MALDI-TOF modo linear positivo. Espectro obtido na faixa de 4000 a 10000 Da em matriz DHB.

Nota-se, através do espectro acima (Fig. 36), que o produto obtido na expressão da rTs8-propeptídeo também se encontra clivado. A massa esperada para a toxina inteira, com os adaptadores é de 9288 Da e a massa obtida foi de 6464.2 Da. Esse fato já era esperado, visto que a Ts8-propeptídeo é muito semelhante à Ts8, diferindo apenas nos oito primeiros aminoácidos e ambas possuem o N-terminal livre suscetível à clivagens.

A massa de 6464.2 é semelhante à massa obtida no pico 4 da clivagem da rTs8 duplamente carregada (Fig. 31 C), demonstrando que a proteólise sofrida foi semelhante entre as toxinas. O produto de clivagem tanto do pico 4 da rTs8 quanto do pico 3 da rTs8 propeptídeo são majoritários em ambas as expressões.

Foram realizados alguns ensaios funcionais com essas frações obtidas tanto na expressão da rTs8 quanto na expressão da rTs8-propeptídeo a fim de avaliarmos a citotoxicidade desses produtos, bem como suas possíveis atividades antimicrobianas.

4.2. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS TOXINAS NATIVAS

4.2.1. Cromatografia da peçonha de T. serrulatus em CM-celulose-52

A primeira etapa cromatográfica consistiu na aplicação de 50 mg da peçonha centrifugada em coluna de troca catiônica carboximetil-celulose 52. Essa primeira etapa cromatográfica foi desenvolvida por Arantes et al. (1989), utilizando um gradiente convexo de concentração de solução de bicarbonato de amônio e modificada por Cerni et al., (2014). Nessa modificação, as frações antes numeradas como VI, VIII, IX, XI e XII no método descrito por Arantes et al., (1989) tiveram uma melhor resolução e foram subdivididas em (VIA-VIB, VIIIA-VIIIB, IXA-IXB, XIA-XIB e XIIA-XIIB) (Fig. 37).



Figura 37. Perfil representativo da cromatografia de 50 mg da peçonha de *Tityus serrulatus* **em CM-celulose-52.** O fracionamento foi realizado em sistema *FPLC Äkta Purifier UPC-10* com coluna de (1,6 x 100 cm) empacotada com resina carboximetil-celulose-52 (Whatman), equilibrada com tampão A (bicarbonato de amônio 0,05 mol/L, pH 7,8), sob vazão de 0,5 mL/min e temperatura de 25°C. A amostra foi eluída com gradiente linear de concentração (0 a 100%) de tampão B (bicarbonato de amônio 0,6 mol/L, pH 7,8), representado pela linha azul. Volume coletado por tubo: 4,0 mL.

A resina de CM-celulose-52 consiste em um polímero que contêm grupos aniônicos, sendo que a purificação acontece de acordo com a carga das proteínas, ou seja, proteínas com

carga semelhante à da resina eluem primeiro, e as com cargas diferentes, mais catiônicas, eluem posteriormente (LEHNINGER, 2010). A eluição acontece pelo aumento da concentração do tampão de bicarbonato de amônio.

A cromatografia acima revelou a presença de XIII frações, algumas divididas em A e B. As frações escolhidas para as próximas etapas cromatográficas foram a fração VIIIB, pois estudos anteriores em nosso laboratório indicaram a presença das toxinas Ts8 e Ts8propeptídeo (*scorpine-like*) nessa fração (LIMA et al., 2015).

4.2.2. Purificação da Ts8 e Ts8-propeptídeo (scorpine-like)

Para a purificação da Ts8 e da Ts8-propeptídeo, a fração VIIIB foi submetida também em uma cromatografia em fase reversa, revelando a presença de 16 picos (Fig. 38).



Figura 38. Perfil representativo da cromatografia em fase reversa da fração VIIIB (450 μ g) obtida da CM-celulose-52. A cromatografia foi realizada em sistema *FPLC Äkta Purifier UPC-10* com coluna C18 (250 x 4,6 mm, com partículas de 5 μ m, Jupiter, Phenomenex), equilibrada com a Solução A (TFA 0,1%), sob vazão de 0,7 mL/min e temperatura de 25°C. A amostra (1 mL) foi inicialmente eluída com solução A, seguindo-se um gradiente de concentração de acetonitrila (solução B – acetonitrila 80% em TFA 0,1%), representado pela linha azul. Volume coletado por tubo: 0,3 mL.

As frações 15 e 16 foram então liofilizadas e submetidas à espectrometria de massas (MALDI-TOF), modo refletido positivo em matriz ácido 2,5 dihidrobenzóico (DHB) (Fig. 39).



Figura 39. Espectro de massas em MALDI-TOF das frações 15 e 16 da figura 38. (A) Espectro da fração 15 da cromatografia em fase reversa, em modo refletido matriz DHB **(B)** Espectro da fração 16 da cromatografia em fase reversa, em modo refletido matriz DHB.

Com relação ao espectro de massas da fração 15 (Fig. 39A), observa-se que o valor obtido foi de 6718 Da, essa massa corresponde à Ts8. Também foi observado um pico de de 7666 Da que possui uma massa corresponde à Ts8-propeptídeo (*scorpine-like*) (BORDON; COLOGNA; ARANTES, 2015). Este espectro confirma a presença da Ts8 como toxina majoritária na fração 15 e a presença da Ts8 propeptídeo.

Já na fração 16, observamos através da espectrometria de massas que a massa obtida corresponde à massa da Ts8 (Fig. 39B). Esse espectro indica que a Ts8 está pura na fração 16. A fração 16 será utilizada para os ensaios posteriores com a Ts8 nativa e a fração 15 será utilizada para comparação dos ensaios com a Ts8-propeptídeo. Várias tentativas de isolar a Ts8-propeptídeo foram realizadas como filtração molecular, outras colunas de fase reversa, entre outros, mas não foi possível obter a Ts8-propeptídeo isolada (dados não mostrados). Por

terem características muito semelhantes, apenas 8 aminoácidos de diferença, pontos isoelétricos praticamente iguais, elas coeluem na fração 15. As frações 15 e 16 também foram submetidas aos ensaios funcionais de citotoxicidade, liberação de óxido nítrico e atividade antimicrobiana juntamente com as toxinas recombinantes.

4.3. ENSAIOS FUNCIONAIS

4.3.1. Estudo Eletrofisiológico com a rTs8.

A rTS8 obtida da clivagem com a enteroquinase (Fig. 21) foi testada em três canais para potássio dependentes de voltagem, o Kv1.1, Kv1.3 e o *Shaker*. Conforme a figura 40 abaixo, observamos que houve uma inibição significativa da corrente iônica em dois dos canais testados.



Figura 40. Estudo eletrofisiológico da rTs8 nos canais para potássio dependentes de voltagem do tipo Kv1.1, Kv 1.3 e *Shaker*. Os gráficos representam as correntes na presença (*) ou ausência de 1 μ M da toxina.

A Ts8 nativa, antes chamada de TsTX-K β , foi inicialmente isolada por Rogowski et al (1994) e demonstrou bloquear canais para potássio de sinaptossomas. Diego-García et al (2008) demonstraram que a Tst β KTx, que é a mesma toxina que a Ts8, porém do escorpião

Tityus stigmurus, inibiu os Kvs1.1, 1.2 e 1.3, sendo a IC50 de inibição do Kv1.1 de 96 \pm 0.9 nM. Pucca et al (2016b), por sua vez, demonstraram que a toxina Ts8, testada em 15 diferentes canais do tipo K_V foi capaz de bloquear especificamente apenas o canal Kv4.2 e teve uma IC₅₀ de 313 \pm 40 nM (quando mensurado em um momento posterior ao teste despolarizante, em um bloqueio de 100% da corrente).

A rTs8 foi testada em 3 canais para potássio do tipo K_V e demonstrou uma inibição significativa em dois dos canais (73,5% para Kv1.1 e 31%. para o Kv1.3) (Fig. 40). Não foi possível testar a toxina no canal Kv4.2, visto que o mesmo não foi expresso satisfatoriamente mesmo após várias tentativas.

Depois das proteínas quinases e receptores acoplados à proteína G, os canais iônicos dependentes de voltagem constituem o terceiro maior grupo de moléculas sinalizadoras codificadas no genoma humano. Os canais para potássio compõem cerca de metade destes genes, nos quais em grande parte estão os canais para potássio dependentes de voltagem (Kvs) (WULFF et al., 2009).

O primeiro K_V clonado foi o canal Shaker de *Drosophila* e assim como os demais possui 4 α subunidades, cada uma com seis segmentos transmembrana. Cada subunidade possui duas hélices transmembrana internas e um *loop* externo formando o poro do canal (MARTIN-EAUCLAIRE et al., 2016).

A abertura dos canais para potássio gera um efluxo de cargas positivas, que servem para repolarizar ou hiperpolarizar a membrana celular. Dessa forma, compostos que bloqueiam canais do tipo K_V inibem a proliferação e suprimem a ativação celular (WULFF et al., 2009).

Por esse motivo, K_vs são considerados alvos terapêuticos potenciais para o tratamento de diversas doenças, desde cânceres a doenças cardíacas, neurológicas e autoimunes (GRIZEL et al., 2014).

Compostos que interagem com Kvs podem ser divididos em: íons metálicos, moléculas orgânicas pequenas (200-500 Da) e peptídeos originados de peçonhas animais (com cerca de 3-6 kDa). Esses compostos podem atuar através do bloqueio ou modulação desses canais (WULFF e ZHOROV, 2008).

Canais para potássio pertencentes a família K_v1 ou *Shaker*, são altamente expressos no sistema nervoso, mas também podem ser encontrados em tecidos periféricos como coração, tecido vascular e sistema imune (WULFF et al., 2009). Ratos nocautes para Kv1.1 exibiriam episódios espontâneos de febre e mudanças estruturais no SNC (Sistema Nervoso Central) e

em humanos a perda da função desse canal está relacionado com febres, ataxia e espasmos e epilepsia (SMART et al., 1998; ZUBERI et al., 1999).

Já o canal do tipo Kv1.3 é expresso em doenças autoimunes, como esclerose múltipla, artrite reumatoide, entre outras (LEWIS, GARCIA, 2003). Esses canais são encontrados em diferentes células do organismo, incluindo macrófagos, plaquetas e células B (WULFF et al., 2004). Além disso, tem sido demonstrado em diversos estudos que eles são expressos em células T de membrana e por isso, tem sido considerado um alvo para supressão dessas células (PUCCA et al., 2015).

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

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

Toxinas que pertencem à família β -KTx, como a Ts8 e Ts8-propeptídeo, possuem dois domínios, o domínio N-terminal (NHD- *N-terminal helical domain*) e o C-terminal (*CCD- C-terminal CSa\beta domain*). O domínio NDH é conhecido por ter atividade citolítica e antimicrobiana enquanto que o domínio CCD possui atividade neurotóxica. A Ts8 nativa de *T. serrulatus* demonstrou anteriormente não possuir atividade citolítica em oócitos, apenas a neurotóxica em Kv4.2 (PUCCA, CERNI, et al., 2016).

Já a rTs8 recombinante, demonstrou bloquear os canais Kvs1.1 e 1.3. A diferença entre a atividade da toxina recombinante e a nativa, pode ser explicada pelo fato da recombinante estar clivada, podendo ter modificado sua estrutura e interferindo assim na interação com o canal. Sabe-se que aminoácidos do N-terminal podem influenciar a atividade das toxinas sobre os canais (ZHU et al., 2010).

4.3.2. Avaliação da liberação ou indução de citocinas de macrófagos alveolares pelas toxinas

4.3.2.1. Ensaio de citotoxicidade – MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio – Sal de tetrazólio)

A peçonha bruta de *T. serrulatus* (Tsv), as toxinas nativas (Ts8 e Ts8+Ts8propeptídeo) e as recombinantes (rTs8 pico 4, rTs8 pico 8 e rTs8-propeptídeo pico 3) foram avaliadas quanto à citotoxicidade em células de macrófagos alveolares (Fig. 41).

A avaliação da viabilidade celular foi realizada por um ensaio colorimétrico que utiliza o sal de tretazólio (MTT; 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico). A mesma foi medida indiretamente pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. A redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) leva a formação do formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água) e é quantificada em 570 nm (MONSMANN, 1983).



Figura 41. Ensaio de citotoxicidade da peçonha (Tsv) e toxinas nativas (Ts8 e Ts8+Ts8prop.) e recombinantes (rTs8 pico4, rTs8 pico8 e rTs8-prop. pico3) em célula de macrófagos alveolares. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico do MTT. Os valores correspondem à média \pm EPM (n = 4).

Observa-se que os peptídeos não causaram citotoxicidade para essas células nas concentrações testadas (Fig. 41). O DMSO (dimetilsulfóxido) foi utilizado como controle de

citotoxicidade e o meio celular como controle de viabilidade. Todas as toxinas testadas mantiveram a viabilidade celular.

4.3.2.2. Dosagem de citocinas

A indução das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β também foram avaliadas nas células de macrófagos alveolares na presença da peçonha bruta (Tsv), das toxinas nativas (Ts8 e Ts8+Ts8-propeptídeo) e recombinantes (rTs8 pico 4, rTs8 pico 8 e rTs8-propeptídeo pico 3) (Fig 42 e Fig 43).



Figura 42. Análise da liberação da citocina TNF- α na presença da peçonha (Tsv), das toxinas nativas (Ts8 e Ts8+Ts8-prop.) e recombinantes (rTs8 pico4, rTs8 pico8 e rTs8-prop. pico3). Os valores correspondem à média ± EPM (n = 4) e os asteriscos indicam resultados significativos (*) p<0,05 (****) p<0,0001).



Figura 43. Análise da liberação da citocina IL-1 β na presença da peçonha bruta (Tsv), das toxinas nativas (Ts8 e Ts8+Ts8-prop.) e recombinantes (rTs8 pico4, rTs8 pico8 e rTs8-prop. pico3). Os valores correspondem à média ± EPM (n = 4) e os asteriscos indicam resultados significativos (*) p<0,05 (***) p<0,0001).

Os resultados apresentados na figura 42 mostram que a peçonha bruta induziu a liberação de TNF- α , bem como a rTs8 pico 4, rTs8 pico8 e a rTs8-propeptídeo pico3 nas maiores concentrações (25 µg/mL). Já foi demonstrado que a peçonha bruta de *T. serrulatus* induz a liberação de TNF- α e IL1-6 em macrófagos peritoneais após 24 h (ZOCCAL et al., 2011). As recombinantes, rTs8 pico4 e rTs8-propeptídeo pico3 mostraram um perfil de indução semelhante, o que pode ser explicado por se tratarem de produtos semelhantes da rTs8 e da rTs8-propeptídeo (Figs. 30C e 35). As toxinas nativas (Ts8 e Ts8+Ts8-propeptídeo) não induziram a liberação de TNF- α pelas células nas concentrações testadas. A citocina TNF- α é produzida em maior parte pelos macrófagos e está relacionada ao aumento de mediadores como prostaglandinas e indução de vasodilatação (MAINI et al., 1995).

Com relação à IL-1 β , nota-se que apenas as nativas (Ts8 e Ts8+Ts8-propeptídeo) induziram sua liberação na maior dose testada. Este é o primeiro trabalho que avalia a indução de citocinas por essas toxinas *in vitro*. A IL-1 β é liberada também na ativação de macrófagos e é um importante mediador da resposta inflamatória. Está envolvida na proliferação celular, diferenciação e apoptose (JEON et al., 2016).

4.3.2.3. Determinação da concentração de nitrito

Foi avaliada também a liberação de óxido nítrico (NO) em células de macrófagos alveolares na presença das toxinas. O óxido nítrico tem uma função importante no envenenamento pela peçonha de *T. serrulatus*. Em pequenas quantidades, o NO contribui para manter a integridade e funcionamento da membrana celular, mas em altas concentrações esttá relacionado a choque séptico, hipertensão e envenenamento severo (PESSINI et al., 2006).



Figura 44: Liberação de nitrito na presença da peçonha (Tsv), das toxinas nativas (Ts8 e Ts8+Ts8-prop.) e recombinantes (rTs8 pico4, rTs8 pico8 e rTs8-prop. pico3). Os valores correspondem à média \pm EPM (n = 4) e os asteriscos indicam resultados significativos (**) p<0,01 (***) p<0,0001).

A peçonha induziu a liberação de óxido nítrico nas três concentrações testadas, bem como a toxina nativa Ts8+Ts8-propeptídeo (25 μ g/mL) e a recombinante rTs8 pico4 na menor concentração (6,25 μ g/mL). A Ts19 frag-I, uma toxina da mesma classe da Ts8 aumentou significativamente à liberação de óxido nítrico em macrófagos peritoneais na concentração de 50 μ g/mL (LIMA et al., 2015). A Ts8+Ts8prop. nativa (25 μ g/mL) também demonstrou um aumento da liberação desse mediador, indicando que essas toxinas podem ter um papel importante na fisiopatologia do envenenamento.
4.3.3. Atividade antimicrobiana

As toxinas nativas (Ts8 e Ts8+Ts8-propeptídeo) e as recombinantes (rTs8 pico4, rTs8 pico8 e rTs8-propeptídeo pico3) também foram avaliadas com relação à atividade antimicrobiana. Para esse teste, foram utilizadas cepas da bactéria *E. coli* (ATCC 25922) e do fungo *Pichia pastoris* (KM71H).

Os halos de inibição foram determinados após a incubação, de acordo com cada microrganismo, e estão apresentados nas tabelas 3 e 4 abaixo:

Tabela 3. Medidas dos diâmetros dos halos (mm) de inibição do crescimento da *E. coli* (ATCC 25922)

Amostras	Medidas dos halos (mm)
Controle (-) PBS	S.H.
Controle (+) Ampicilina	10±2,68
(500 mg/ml)	
Ts8 nativa (5 µg)	S.H
Ts8 nativa (10 µg)	S.H
Ts8+Ts8-prop. nativa (5 µg)	S.H
Ts8+Ts8-prop. nativa (10 µg)	S.H
rTs8 pico4 (5 µg)	S.H
rTs8 pico4 (10 µg)	S.H
rTs8 pico8 (5 µg)	S.H
rTs8 pico8 (10 µg)	S.H
rTs8-prop. pico3 (5 µg)	S.H
rTs8-prop. pico3 (10 µg)	S.H

*S.H: Sem halo de inibição

Amostras	Medidas dos halos (mm)		
Controle (-) PBS	S.H.		
Controle (+) Anfotericina B	8±2,38		
(64 µg/mL)			
Ts8 (5 μg)	S.H		
Ts8 (10 µg)	10±1,58		
Ts8+Ts8-prop. (5 μg)	12±2,3		
Ts8+Ts8-prop. (10 μg)	14±2,7		
rTs8 pico4 (5 µg)	S.H		
rTs8 pico4 (10 µg)	S.H		
rTs8 pico8 (5 µg)	4±0,68		
rTs8 pico8 (10 µg)	2±1,3		
rTs8-prop. pico3 (5 µg)	6±0,7		
rTs8-prop. pico 3 (10 µg)	2±1,6		

Tabela 4. Medidas dos diâmetros dos halos (mm) de inibição do crescimento da *Pichia pastoris* (KM71H)

*S.H: Sem halo de inibição

Conforme demonstrado nas tabelas 3 e 4 acima, as toxinas não inibiram o crescimento bacteriano nas doses testadas. Já com relação ao fungo, nota-se que todas as toxinas inibiram o crescimento da *P. pastoris*, exceto a rTs8 pico4. Optou-se por utilizar a cepa KM71H neste ensaio, pois essa é a mesma utilizada na expressão das toxinas e desejou-se avaliar se as recombinantes estavam afetando o crescimento do fungo.

Dessa forma, fica evidente que as toxinas possuem uma atividade antifúngica e isso explica em grande parte a proteólise sofrida pelas mesmas no meio de expressão. Nota-se também que o principal produto da proteólise da expressão (rTs8 pico4) não tem atividade inibitória, fato que pode explicar o motivo deste produto ser majoritário na produção da rTs8.

A Ts8-propeptídeo é uma toxina *scorpine-like*, semelhante à scorpine identificada no escorpião *P. imperator*. A scorpine demonstrou atividade bactericida em *Bacillus subtilis* e em *Kleibsiella pneumoniae* (CONDE et al., 2000). Além disso, a *scorpine-like* do escorpião *Hoffmannihadrurus gertschi* demonstrou atividade antiparasitária em *Entamoeba histolytica* (FLORES-SOLIS et al., 2016).

Com relação à atividade antifúngica, vários PAMs (peptídeos antimicrobianos) de escorpiões como *T. obscurus, Tityus costatus, Hadrurus gertschi,* e *Opisthacanthus cayaporum* foram testados e demonstraram atividade fungicida (GUILHELMELLI et al., 2016). Apesar disto, esse é o primeiro trabalho que demonstra a inibição do crescimento fúngico pelas toxinas Ts8 e Ts8-propeptídeo. Isso contribui para elucidação de mecanismos inerentes à peçonha do escorpião *T.serrulatus*, bem como abre caminhos para a descoberta de potenciais antifúngicos já que os mesmos foram tóxicos para as células de *P.pastoris* porém não foram citotóxicos em células de macrófagos alveolares de murinos. Além disso, fica evidente que a expressão desses produtos sofre degradação proteolítica pela *Pichia* tanto por sua estrutura ser suscetível à essa degradação, quanto por sua atividade tóxica para o fungo. A produção de enzimas proteolíticas da *P. pastoris* deve ser intensificada como mecanismo de proteção, visando a clivagem das toxinas rTs8 e rTs8-propeptídeo, que são lesivas para a levedura. As toxinas devem ser expressas com a sequência completa, mas clivagem da região N-terminal deve ser iniciada assim que as concentrações das toxinas recombinantes sejam suficientes para causar danos às células.

Fica assim evidente que a expressão de proteínas com ação antifúngica em *P. pastoris* pode ser dificultada, porque esta levedura pode destruir o produto recombinante esperado, se o mesmo possuir em sua estrutura sítios de clivagem das enzimas produzidas pelo fungo. A adição de casaminoácidos e inibidores de proteases pode minimizar a degradação proteolítica das toxinas recombinantes.

Uma outra alternativa na produção desses peptídeos seria modificar o sistema de expressão. Atualmente, além da *E.coli* e *P. pastoris*, outros sistemas vêm sendo utilizados com sucesso na expressão de peptídeos antimicrobianos. Entre eles podemos citar os cloroplastos, que são organelas semiautônomas e que possuem seu próprio sistema de expressão (YAGI e SHIINA, 2014). DeGray et al. (2001) expressaram o peptídeo antimicrobiano MS-99, um análogo da magainin 2, através do genoma de cloroplasto em tabaco. Na última década esse sistema de expressão tem sido cada vez mais utilizado e têm demonstrado sucesso na obtenção de diversos biofármacos (ZHANG et al., 2017).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

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

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

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

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

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

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

Esse trabalho foi pioneiro na expressão heteróloga das toxinas rTs8 e rTs8propeptídeo, bem como na avaliação da liberação de citocinas induzida pelas toxinas e de suas atividades antimicrobianas. Além disso, o presente trabalho contribuiu significativamente para o conhecimento sobre a expressão em *Pichia pastoris*, pelos estudos realizados com mudanças em diferentes parâmetros de expressão heteróloga, bem como na caracterização das proteases presentes neste fungo e seus sítios de clivagem.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

AHMAD, M. et al. Protein expression in Pichia pastoris: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 98, n. 12, p. 5301-17, 2014.

AMORIM, F.G. **Clonagem e expressão heteróloga da hialuronidase e/ou novas toxinas obtidas a partir do transcriptoma da glândula da peçonha de** *Tityus serrulatus***. 2015, 119 p. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.**

ANANGI, R. et al. Recombinant expression of margatoxin and agitoxin-2 in *Pichia pastoris*: an efficient method for production of KV1.3 channel blockers. **PLoS One,** v. 7, n. 12, p. e52965, 2012.

ARANTES, E. C. et al. A simplified procedure for the fractionation of *Tityus serrulatus* venom: isolation and partial characterization of TsTX-IV, a new neurotoxin. **Toxicon**, v. 27, n. 8, p. 907-16, 1989.

AYED, A. et al. High level production and purification of human interferon alpha2b in high cell density culture of *Pichia pastoris*. **Enzyme Microb Technol,** v. 42, n. 2, p. 173-80, 2008.

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

BERGERON Z.L.; BINGHAM J-P. Scorpion toxins specific for potassium (K⁺) channels: a historical overview of peptide bioengineering. **Toxins**, v. 4, n. 11, p.1082-119, 2012.

BERTAZZI, D. T. et al. Activation of the complement system and leukocyte recruitment by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Int Immunopharmacol**, v. 5, n. 6, p. 1077-84, 2005.

BOLDRINI-FRANÇA, J. **Expressão e caracterização de uma protease de interesse biotecnológico clonada da glândula de peçonha de** *Crotalus durissus terrificus*. 2013, 117p. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

BOLDRINI-FRANCA, J. et al. Expression of a new serine protease from *Crotalus durissus collilineatus* venom in *Pichia pastoris* and functional comparison with the native enzyme. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, n. 23, p. 9971-86, 2015.

BORDON K.C.F., COLOGNA C.T., ARANTES E.C. Scorpion venom research around the world: *Tityus serrulatus*. In: Gopalakrishnakone P., Possani L.D., Schwartz E.F., Rodríguez de la Vega R.C., ed. **Scorpion Venoms**. Dordrecht: Springer Netherlands; 2015. p. 411-438.

BOSMANS, F.; TYTGAT, J. Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alphatoxins. **Toxicon**, v. 49, n. 2, p. 142-58, 2007.

CARMO, A. O. et al. Molecular and functional characterization of metalloserrulases, new metalloproteases from the *Tityus serrulatus* venom gland. **Toxicon**, v. 90, p. 45-55, 2014.

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

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Rev**, v. 24, n. 1, p. 45-66, 2000.

CERNI, F. A. et al. Isolation and characterization of Ts19 Fragment II, a new long-chain potassium channel toxin from *Tityus serrulatus* venom. **Peptides**, v. 80, p. 9-17, 2016.

CERNI, F. A. et al. Electrophysiological Characterization of Ts6 and Ts7, K+ Channel Toxins Isolated through an Improved *Tityus serrulatus* Venom Purification Procedure. **Toxins**, v. 6, n. 3, p. 892-913, 2014.

CHEN, Z. Y. et al. Hg1, Novel Peptide Inhibitor Specific for Kv1.3 Channels from First Scorpion Kunitz-type Potassium Channel Toxin Family. **J Biol Chem,** v. 287, n. 17, p. 13813-21, 2012.

CHIPPAUX, J.P. Emerging options for the management of scorpion stings. **Drug Design Development Therapy**, v.6, p.165–173, 2012.

COLOGNA, C. T. et al. *Tityus serrulatus* scorpion venom and toxins: an overview. **Protein Pept Lett**, v. 16, n. 8, p. 920-32, 2009.

CONDE, R. et al. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. **FEBS Lett,** v. 471, n. 2-3, p. 165-8, 2000.

CORDEIRO, F. A. et al. Arachnids of medical importance in Brazil: main active compounds present in scorpion and spider venoms and tick saliva. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 21, p. 24, 2015.

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

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

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

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

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

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

D'SUZE, G. et al. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of genes from a cDNA library of the scorpion Tityus discrepans. **Biochimie**, v. 91, n. 8, p. 1010-9, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GUILHELMELLI, F. et al. Activity of Scorpion Venom-Derived Antifungal Peptides against Planktonic Cells of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* Biofilms. **Front Microbiol**, v. 7, p. 1844, 2016. GUO, X. et al. Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. **Biochimie**, v. 95, n. 9, p. 1784-94, 2013.

HARRISON, P. L. et al. Antimicrobial peptides from scorpion venoms. **Toxicon**, v. 88, p. 115-37, 2014.

HIGGINS, D. R.; CREGG, J. M. Introduction to *Pichia pastoris*. **Methods Mol Biol,** v. 103, p. 1-15, 1998.

HILT, W.; WOLF, D. H. Stress-Induced Proteolysis in Yeast. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 17, p. 2437-2442, 1992.

HOFINGER, E. S. et al. Recombinant human hyaluronidase Hyal-1: insect cells versus *Escherichia coli* as expression system and identification of low molecular weight inhibitors. **Glycobiology**, v. 17, n. 4, p. 444-53, 2007.

HONG, F.; MEINANDER, N. Q.; JONSSON, L. J. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 438-449, 2002.

HUGHES, R. A.; MIKLOS, A. E.; ELLINGTON, A. D. Gene synthesis: methods and applications. **Methods Enzymol,** v. 498, p. 277-309, 2011.

INAN, M. et al. Optimization of temperature-glycerol-pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 7, p. 438-445, 1999.

ISLAS, L. D. Functional diversity of potassium channel voltage-sensing domains. **Channels**, v. 10, n. 3, p. 202-213, 2016.

JAHIC, M. et al. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. **Journal of Biotechnology,** v. 102, n. 1, p. 45-53, 2003.

JEON, M. et al. Elevated IL-1beta expression induces invasiveness of triple negative breast cancer cells and is suppressed by zerumbone. **Chem Biol Interact**, v. 258, p. 126-33, 2016.

KALAPOTHAKIS, E. et al. Screening of expression libraries using ELISA: identification of immunogenic proteins from *Tityus bahiensis* and *Tityus serrulatus* venom. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 679-85, 2001.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MACAULEY-PATRICK, S. et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249-70, 2005.

MAINI, R. N. et al. Monoclonal anti-TNF alpha antibody as a probe of pathogenesis and therapy of rheumatoid disease. **Immunol Rev,** v. 144, p. 195-223, 1995.

MARCUSSI, S., ARANTES, E.C.; SOARES, A.M. Escorpiões: **Biologia, envenenamento e mecanismos de ação de suas toxinas**. In: Biologia. FUNPEC-Editora, São Paulo, 2011, 140p.

MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. et al. Production of active, insect-specific scorpion neurotoxin in yeast. **FEBS**, v. 223, n. 2, p. 637-645, 1994.

MARTIN-EAUCLAIRE, M. F. et al. Potassium channel blockers from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* (Lutz and Mello, 1922). **Toxicon**, v. 119, p. 253-265, 2016.

MENDES, T. M. et al. Effective *Tityus serrulatus* anti-venom produced using the Ts1 component. **Toxicon**, v. 52, n. 7, p. 787-93, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

MOUHAT, S. et al. Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. **Curr Pharm Des,** v. 14, n. 24, p. 2503-18, 2008.

NI, Z. H. et al. Decrease of hirudin degradation by deleting the KEXI gene in recombinant *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2008.

NIU, M. F. et al. The molecular design of a recombinant antimicrobial peptide CP and its in vitro activity. **Protein Expression and Purification,** v. 57, n. 1, p. 95-100, 2008.

ORTIZ, E. et al. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. **Toxicon**, v. 93, p. 125-35, 2015.

PARACHIN, N. S. et al. Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. **Peptides**, v. 38, n. 2, p. 446-56, 2012.

PEIGNEUR, S. et al. A gamut of undiscovered electrophysiological effects produced by *Tityus serrulatus* toxin 1 on Na-V-type isoforms. **Neuropharmacology**, v. 95, p. 269-277, 2015.

PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 48, p. 29987-29990, 1997.

PESSINI, A. C. et al. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1495-504, 2001.

PESSINI, A. C. et al. Mediators involved in the febrile response induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. **Toxicon**, v. 48, n. 5, p. 556-66, 2006.

PETRICEVICH, V. L.; LEBRUN, I. Immunomodulatory effects of the *Tityus serrulatus* venom on murine macrophage functions in vitro. **Mediators Inflamm,** v. 2005, n. 1, p. 39-49, 2005.

PIMENTA, A. M. C. et al. Moving pieces in a proteomic puzzle: mass fingerprinting of toxic fractions from the venom of *Tityus serrulatus* (Scorpiones, Buthidae). **Rapid** Communications in Mass Spectrometry, v. 15, n. 17, p. 1562-1572, 2001.

POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. S. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris:* A review. **Biochemical Engineering Journal,** v. 64, p. 91-105, 2012.

PUCCA, M. B. et al. Influence of post-starvation extraction time and prey-specific diet in *Tityus serrulatus* scorpion venom composition and hyaluronidase activity. **Toxicon**, v. 90, p. 326-36, 2014.

PUCCA, M. B. et al. Immunosuppressive evidence of *Tityus serrulatus* toxins Ts6 and Ts15: insights of a novel K+ channel pattern in T cells. **Immunology**, v. 147, n. 2, p. 240-250, 2016.

PUCCA, M. B. et al. *Tityus serrulatus* venom - A lethal cocktail. **Toxicon**, v. 108, p. 272-284, 2015.

PUCCA, M. B. et al. Ts8 scorpion toxin inhibits the Kv4.2 channel and produces nociception in vivo. **Toxicon**, v. 119, p. 244-52, 2016.

PUKRITTAYAKAMEE, S. et al. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 629-37, 1988.

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

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

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

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

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

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

SCOPES, R. K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. Analytical Biochemistry, v. 59, n. 1, p. 277-282, 1974.

SCORPION FILES. Disponível em <http://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>. Acesso em 20 de março de 2017.

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

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

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

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

SILVA, E. C. et al. Cloning and characterization of cDNA sequences encoding for new venom peptides of the Brazilian scorpion *Opisthacanthus cayaporum*. **Toxicon**, v. 54, n. 3, p. 252-61, 2009.

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

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

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

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

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

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

VERANO-BRAGA, T. et al. Moving Pieces in a Venomic Puzzle: Unveiling Posttranslationally Modified Toxins from Tityus serrulatus. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 7, p. 3460-3470, 2013.

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

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

WERTEN, M. W. T.; DE WOLF, F. A. Reduced proteolysis of secreted gelatin and Yps1mediated alpha-factor leader processing in a *Pichia pastoris* kex2 disruptant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2310-2317, 2005. WULFF, H.; CASTLE, N. A.; PARDO, L. A. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 12, p. 982-1001, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXOS

Anexo I

Certificado de Regularidade do IBAMA para utilização de diferentes venenos animais.

gistro nº:	15067	48	Data da consulta:	28/04/2017	CR emitido em	28/04/2017	CR válido até:	28/07/2017	
					Dados bás	iccs			
CNPJ: 63.025.530/D026- Razão social: FACULDADE DE I			26-52						
			DE MEDICINA DE F	EDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP					
Nome fantasia: FMRP - CRIADOU			OURO CIENTÍFICO	DAUSP					
Data de abe	ertura:	21/05/1952							
					Endereç	0			
Logradouro: AV. BANDEIRANTES 3		ANDEIRANTE	ANDEIRANTES 3900 C			plemento: CAMPU	S DA USP		
					Municipio: RIBEIRAO PRETO				
Bairro:	NON	IONTE AL EGRE			UF SP				
CEP: 14049-900		-900							
		Ca	dastro Técnico Fed	eral de Atividades Poter	cialmente Polui	doras e Utilizadoras	de Recursos Ambien	tais-CTF/APP	
Categoria 20. Line de Desurace Alsturace		45 priação	Detalhe						
	20 - Uso de Recursos Naturais 45 - chação do natrimônio gené		cientifica de feuria silvesi	ético natural - coleta de material biológico com finalidade científica ou didática					

Anexo II

Região "Multiple cloning site" do vetor pPICZα A MCS 5' end of AOX1 mRNA 5' AOX1 priming site 811 AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA 871 CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTTAACGA CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT 931 ATTCGAAACG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala 983 TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala α-factor signal sequence 1034 CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe 1085 gat gtt gct gtt ttg cca ttt tcc aac agc aca aat aac ggg tta ttg ttt Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe Xho I* 1136 ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu Kex2 signal cleavage EcoR | Pm/I Sfi | BsmB | Asp718 | 1187 GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAATTCAC GTGGCCCAG CCGGCCGTC TCGGATCGGT Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Ste13 signal cleavage c-myc epitope Kpn | Xho | Sac || Not | Xba | 1244 ACCTCGAGCC GCGGCGGCC GCCAGCTTTC TA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu polyhistidine tag 1299 GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTGTAGCC Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His *** 1351 TTAGACATGA CTGTTCCTCA GTTCAAGTTG GGCACTTACG AGAAGACCGG TCTTGCTAGA 3' AOX1 priming site 1411 TTCTAATCAA GAGGATGTCA GAATGCCATT TGCCTGAGAG ATGCAGGCTT CATTTTGAT 3' polyadenylation site 1471 ACTITITTAT TIGTAACCTA TATAGTATAG GATTTTTTT GTCATTTGT TICTTCTCGT