



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular



GABRIEL OTTO MEISSNER

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE TOXINAS RECOMBINANTES  
PERTENCENTE À FAMÍLIA DAS NOTINAS PRESENTE DO VENENO DE  
ARANHA-MARROM (*Loxosceles intermedia*)

Curitiba 2016

GABRIEL OTTO MEISSNER

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE TOXINAS RECOMBINANTES  
PERTENCENTE À FAMÍLIA DAS NOTINAS PRESENTE DO VENENO DE  
ARANHA-MARROM (*Loxosceles intermedia*)

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Olga Meiri Chaim

Co-orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

CURITIBA 2016

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná  
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

## ATA DA TRECENTÉSIMA OCTOGÉSIMA SETIMA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Aos quinze dias do mês de Março de dois mil e dezesseis, às 14h00min, nas dependências do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, composta pelos Profs: Drs. Daniela Fiori Gradia (Instituto Carlos Chagas), Roseli Wassen (Universidade Estadual de Ponta Grossa), Rafael Bertoni da Silveira (Universidade Estadual de Ponta Grossa), Rubens Bertazolli Filho (Universidade Federal do Paraná), e Silvio Sanches Veiga (como Co-orientador e presidente da banca examinadora da Universidade Federal do Paraná), com a finalidade de julgar a Tese do candidato **Gabriel Otto Meissner**, intitulada: "Obtenção e caracterização funcional de toxinas recombinantes pertencente à família das notinas presente do veneno de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*)" para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular. O candidato teve em torno de 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação e cada examinador, teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de mais 30 (trinta) minutos para resposta do candidato ou de 60 (sessenta) minutos, quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo co-orientador, Dr. Silvio Sanches Veiga. Após analisar a tese e arguido o candidato, os membros da banca examinadora deliberaram pela ".....", habilitando-o ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular. A emissão do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

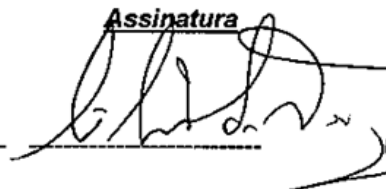
### Examinador/Afiliação

### Parecer

### Assinatura

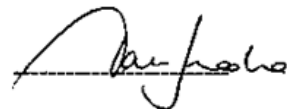
**Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga**  
Co-orientador e presidente da banca  
Universidade Federal do Paraná

Aprovado



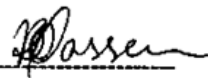
**Profa. Dra. Daniela Fiori Gradia**  
Instituto Carlos Chagas - ICC

Aprovado



**Profa. Dra. Roseli Wassen**  
Universidade Federal do Paraná

Aprovado



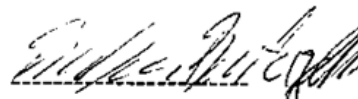
**Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira**  
Universidade Estadual de Ponta Grossa

APROVADO



**Prof. Dr. Rubens Bertazolli Filho**  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

APROVADO



CENTRO POLITÉCNICO - CEP 81.531-990 - JARDIM DAS AMÉRICAS - Caixa Postal 19031 - FONE (41) 3361-1645 FAX 3266-2042 - E-Mail: pgbiocel@ufpr.br - www.pgbiocel.ufpr.br CURITIBA - PR

Setor de Ciências Biológicas  
Caixa Postal 19031  
81531-990 - Curitiba - PR

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer a minha orientadora Olga Chaim por toda dedicação e apoio a minha pessoa, por ter acreditado em mim desde minha entrada como IC no lab vários anos atrás e até me apoiar na realização do estágio na Austrália, que pra mim foi um marco na minha formação.

Muito obrigado ao professor Silvio, que considero um grande exemplo de pesquisador para mim e para o país. Com seu jeito único mantém o lab e o grupo funcionando eficientemente. Desculpo até o fato dele ser corintiano.

Um muito obrigado ao professor Glenn King da The University of Queensland, Brisbane, Austrália, por ter me recebido de maneira muito agradável em seu grupo durante meu estágio em seu laboratório. Esse período ajudou a consolidar e expandir a minha visão sobre ciência e cientista no mundo.

Agradeço a professora Andrea, por todo apoio desde o começo da minha caminhada científica sendo minha primeira orientadora de IC e contribuindo muito para minha formação.

A minha mestre e guru Dilza que muito se dedicou a me treinar no laboratório me ensinando de tudo, do teórico e prático, fico muito feliz de ter trabalhado com você.

Agradeço aos meus amigos do laboratório, ao Fernando que sempre lutamos e discutimos juntos para resolver as dificuldades encontradas na realização do projeto. Ao Thiago meu amigo desde que entramos no lab passando por todas as coisas juntos. Ao Adriano pelas discussões científicas e sobre a vida, inclusive na fabricação das gambiarras. As amigas Valéria, Larissa, Mariana, Aline e Daniele pelo companheirismo e amizade em todo esse tempo.

Aos IC's que me ajudaram durante a realização dos trabalhos em especial ao Eduardo e Hanna, que participaram em muitos momentos. Mas também aos vários outros que tive o prazer de conviver e trabalhar nesses anos.

Ao Bruno Madio pessoa fantástica que tive oportunidade de conhecer e conviver na Austrália, e me ajudou muito durante minha estadia.

Aos amigos que trabalhei na Austrália, Volker, Yanni, Irene, Jan, Jessie, Einvind, Linlin e Fernanda, que me ensinaram muitas coisas e fizeram minha experiência muito valiosa.

Um muito obrigado a minha família, meus avós Tino e Anna que me deram todo o apoio para que eu pudesse me dedicar aos meus estudos.

Aos meus pais que desde de sempre fizeram de tudo para que pudéssemos nos concentrar nos estudos e investiram na nossa formação.

Ao meu irmão Matheus que sempre esteve ao meu lado, só nós sabemos o quanto já conversamos nessa vida e quanto já progredimos e quanto esperamos progredir.

As minhas irmãs Carolina e Anna Barbara quem eu gosto muito e sempre tivemos bons momentos.

Ao meu avô Egon, um exemplo de boa pessoa, trabalhador que me ensinou muito sobre trabalhos em madeira e oficina que são um hobbie meu.

A Renata Ferreira uma mulher especial que dedicou muito do seu tempo a mim, com que passei os melhores anos da minha vida foi ótimo ter você em minha vida.

E sem dúvidas um muito obrigado a todas as pessoas as pessoas que de alguma forma passaram pela minha vida de maneira positiva, aprendi com todos, alguma coisa que carregarei para sempre.

**“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.**

Adaptado de Oliver Wendell Holmes Sr

**“Tudo aquilo que o homem ignora, não existe para ele. Por isso o universo de cada um, se resume no tamanho de seu saber”.**

Albert Einstein

### **Lista de abreviaturas e siglas**

BMGY: Meio complexo tamponado contendo glicerol  
BMMY: Meio complexo tamponado contendo metanol  
BSA : Albumina de soro bovina (“Bovine Serum Albumin”)  
CaCl<sub>2</sub>: Cloreto de cálcio  
CCK: Nó de Cistina Cíclico (“Cyclic Cystine Knot”) ()  
cDNA: DNA complementar  
D.O.: densidade óptica  
FLIPR: Leitor de Placas de Imagem Fluorescente (“Fluorescent Imaging Plate Reader”)  
GFCK: Fator de Crescimento Nó de Cistina (“Growth Factor Cystine Knot”)  
HILIC: Cromatografia de interações hidrofílicas (“Hydrophilic Interaction Chromatography”)  
HSQC: Correlação heteronuclear quântica única (“Heteronuclear Single Quantum Coherence”)  
IC50: Concentração de inibição 50 (“Inhibitor concentration 50”)  
ICK: nó de cistina inibidor (Inhibitory Cystine Knot)  
IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo  
KCl: Cloreto de potássio  
LB: Luria-Bertani  
LD50: Dose letal 50  
MALDI-TOF: Ionização da matriz assistida por laser- tempo de voo (“Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Fly”)  
MBP: Proteína ligante de maltose (“Maltose Binding Protein”)  
MES: ácido 4-morfolinoetanosulfônico  
mRNA: RNA mensageiro  
MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio  
MgSO<sub>4</sub>: Sulfato de Magnésio  
NaCl: Cloreto de sódio  
NaHCO<sub>3</sub>: Bicarbonato de sódio  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Fosfato de sódio monobásico  
NCBI: do inglês, “National Center for Biotechnology Information”  
Ni-NTA: Níquel-ácido nitrilotriacético

PBS: Solução salina tamponada com fosfato (“Phosphate Buffer Saline”)

PCR: reação em cadeia da polimerase

PD50: dose de parálise 50

pI: ponto isoelétrico

pH: potencial hidrogeniônico

RMN: Ressonância magnética nuclear

RP-HPLC: Cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (“reverse phase high performance liquid chromatography”)

rpm: rotações por minuto

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (“Sodium Dodecyl Sulfate-Poliacrilamide Gel Electrophoresis”)

SOC: Meio ótimo de crescimento com repressão de catabólitos (Super Optimal broth with Catabolite repression)

TFA: Ácido trifluoroacético (“Trifluoroacetic acid”)

YPD: Yeast Extract-Peptide-Dextrose



## Sumário

<b>SUMÁRIO .....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>12</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 GÊNERO <i>LOXOSCELES</i> .....	13
1.2 VENENO LOXOSCÉLICO .....	14
1.3 PEPTÍDEOS INSETICIDAS RICOS EM RESÍDUOS DE CISTEÍNA .....	19
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 CLONAGEM DA U2-SCRTX-LIT2 EM VETORES DE EXPRESSÃO DE <i>E. COLI</i> .....	25
3.2 TRANSFORMAÇÃO PARA EXPRESSÃO DA U2-SCRTX-LIT2 EM BACTÉRIA .....	25
3.3 TESTES DE MINIEXPRESSÃO DA U2-SCRTX-LIT2.....	26
3.4 EXPRESSÃO DA U2-SCRTX-LIT2 .....	26
3.5 PURIFICAÇÃO DA U2-SCRTX-LIT2 RECOMBINANTE .....	27
3.6 QUANTIFICAÇÃO DE CONTEÚDO PROTEICO.....	27
3.7 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS QUE RECONHEÇAM A U2-SCRTX-LIT2 RECOMBINANTE.....	27
3.8 WESTERN BLOTTING (W.B.).....	28
3.9 ENSAIO DE PARALISE EM INSETOS .....	28
3.10 CLONAGEM DA SEQUÊNCIA CODIFICANTE DE U2-SCRTX-LIT2 EM VETOR pPICZAC .....	29
3.11 TRANSFORMAÇÃO E EXPRESSÃO DAS CONSTRUÇÕES U2-SICARITOXIN-LIT2/pPICZAC EM CEPAS DE <i>PICHIA PASTORIS</i> .....	29
3.12 TESTE DE EXPRESSÃO DA U2-SICARITOXIN-LIT2 EM <i>PICHIA PASTORIS</i> EM ALTA DENSIDADE DE CÉLULAS 30	
3.13 WESTERN BLOTTING DE COLÔNIA DE <i>PICHIA PASTORIS</i> .....	31
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS DOUTORADO SANDUÍCHE .....</b>	<b>31</b>
3.14 OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIA E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA U2-SCRTX-LIT2.....	31
3.15 PURIFICAÇÃO DA U2-SCRTX-LIT2.....	31
3.16 SUBCLONAGEM E EXPRESSÃO DA U2-SCRTX-LIT1B .....	32
3.17 PURIFICAÇÃO DA U2-SCRTX-LIT1B .....	32
3.18 TESTE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS TOXINAS RECOMBINANTES EM MOSCAS .....	33
3.19 ENSAIO ELETROFISIOLÓGICO EM <i>FLUOROMETRIC IMAGING PLATE READER</i> (FLIPR).....	33
3.20 DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DA U2-SCRTX-LIT1B POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) .....	34
3.21 OBTENÇÃO DAS SEQUENCIAS E EXPRESSÃO U1-SCRTX-LIT1A E U1-SCRTX-LIT1B.....	35
3.22 PURIFICAÇÃO DA U1-SCRTX-LIT1A E DA U1-SCRTX-LIT1B.....	35
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
4.1 CLONAGEM DA U2-SCRTX-LIT2 EM VETORES DE EXPRESSÃO PARA BACTÉRIAS .....	36
4.2 EXPRESSÃO DAS CONSTRUÇÕES PARA U2-SCRTX-LIT2 .....	38
4.3 ENSAIO DE PARÁLISE EM GRILOS DA U2-SCRTX-LIT2 .....	41
4.4 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-U2-SCRTX-LIT2 EM COELHOS .....	42
4.4 CLONAGEM DA U2-SCRTX-LIT2 EM VETOR DE EXPRESSÃO PARA <i>PICHIA PASTORIS</i> .....	43
4.5 EXPRESSÃO DE U2-SCRTX-LIT2 EM <i>PICHIA PASTORIS</i> .....	45
4.6 WESTERN BLOTTING DE COLÔNIA E PRESSÃO DE SELEÇÃO POR ANTIBIÓTICO .....	49

4.7 EXPRESSÃO E TESTE DE ATIVIDADE DE U2-SICARITOXIN-LIT2A EM <i>P. PASTORIS</i> .....	51
<b>4. RESULTADOS DOUTORADO SANDUÍCHE</b> .....	<b>52</b>
4.8 EXPRESSÃO DA TOXINA U2-SCRTX-LIT2 EM BACTÉRIA .....	53
4.9 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA U2-SCRTX-LIT1B EM <i>E. COLI</i> .....	57
4.10 DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DA U2-SCRTX-LIT1B POR RMN.....	58
4.11 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA U2-SCRTX-LIT1B EM MOSCAS .....	62
4.12 ATIVIDADE DA U2-SCRTX-LIT1B EM CANAIS IÔNICOS DE MAMÍFEROS .....	63
4.13 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS U1-SCRTX-LIT1A E U1-SCRTX-LIT1B .....	63
4.14 TESTE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS U1-SCRTX-LIT1A E U1-SCRTX-LIT1B .....	69
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>74</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>92</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>93</b>
<b>8 ARTIGOS</b> .....	<b>114</b>

## RESUMO

As aranhas-marrons são aracnídeos peçonhentos que pertencem ao gênero *Loxosceles*. No Estado do Paraná, a espécie *Loxosceles intermedia* é a mais frequente e, devido ao grande número de acidentes que causa, possui importância médica. O veneno dessas aranhas é uma mistura cristalina de proteínas e peptídeos de baixa massa molecular (5-40 kDa), sendo que as enzimas são as mais estudadas, tais como as fosfolipases-D, metaloproteases e hialuronidases. O transcriptoma da glândula de veneno confirmou a existência de diferentes classes de toxinas e revelou a predominância de transcritos para diversas toxinas potencialmente inseticidas (56%) pertencentes a família das notinas, as quais foram pouco estudadas até o momento. Peptídeos inseticidas já foram descritos para o veneno de *L. intermedia* onde três peptídeos, LiTx 1, LiTx 2 e LiTx 3, foram purificados do veneno e mostraram atividade inseticida sobre larvas de mariposa, *Spodoptera frugiperda*. O presente trabalho visou o estudo de toxinas inseticidas da família das notinas presentes no veneno de *L. intermedia*. A toxina do tipo notina que foi foco inicial do trabalho, apresenta 52% de identidade aminoacídica com uma toxina inibidora de canal de sódio de insetos encontrada na aranha *Macrothele gigas*. A partir da biblioteca de cDNA do transcriptoma, a U2-SCRTX-Lit2, foi clonada e expressa heterologicamente em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*. Mesmo a toxina sendo expressa em condições solúveis ela não apresentou atividade biológica quando testada. Foram também expressas em *E. coli* e testadas outras três toxinas (U2-SCRTX-Lit1b, U1-SCRTX-Lit1a e U1-SCRTX-Lit1b) potencialmente inseticidas presentes no veneno de *L. intermedia*, essas foram purificadas e tiveram sua atividade biológica testada em moscas. Todas as três toxinas apresentaram atividade inseticida e baixa atividade sobre canais iônicos de mamíferos. Também foi possível determinar a estrutura da U2-SCRTX-Lit1b por RMN, onde obteve-se a primeira estrutura resolvida de toxina da família ICK com cinco pontes dissulfeto. Os dados gerados reforçam a ideia de aplicação biotecnológica de toxinas de aranha. A caracterização de toxinas inseticidas presentes no veneno de *L. intermedia* contribui com a expansão do conhecimento sobre o veneno de aranha marrom e além disso com a ideia de desenvolver um agente bioinseticida, que pode apresentar baixa toxicidade para mamíferos.

## Abstract

Brown spiders are venomous animals which belong to *Loxosceles* genus. At Paraná state, *Loxosceles intermedia* is the most abundant specie, and it is medically important due to great number of envenomation it causes. *L. intermedia* venom is a cristal clear mixture of proteins and peptides of low molecular weight (5-40 kDa), and the most studied ones are the enzymes, as phospholipases-D, metalloproteases and hyaluronidases. The venom gland transcriptome confirmed the existence of several toxins classes where the predominant transcripts were for potentially insecticidal toxins (56%) belonging to knottin family, under studied up to date. Insecticidal peptides already were described for *L. intermedia* venom where three peptides, LiTx 1, LiTx 2 and LiTx 3, were purified from whole venom and show insecticidal activity against moth larvae (*Spodoptera litura*). Our aim was the insecticidal toxins from knottin family from *L. intermedia* venom. A knottin toxin was the first subject of our work, it has 52% of amino acidic identity with a sodium channel inhibitor toxin from *Macrothele gigas* spider. From a cDNA library the U2-SCRTX-Lit2 were cloned and recombinant expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. We were able to express it in a soluble way, but the toxin didn't show biological activity when tested. We also express in *E. coli* and test three other insecticidal toxins (U2-SCRTX-Lit1b, U1-SCRTX-Lit1a e U1-SCRTX-Lit1b) from *L. intermedia* venom, with activity over sheep blowflies. All three toxins are insecticidal and has low activity over mammal ion channels. We also were able to solve the molecular structure of U2-SCRTX-Lit1b by NMR spectroscopy, and it's the first structure with five disulphide bonds from knottin family solved. The data reinforce the biotechnological application for spider toxins. The characterization of insecticidal toxins from *L. intermedia* venom contributes to increase the knowledge about brown spider venom and with the aim of develop a new bioinsecticide agent that can have low toxicity for mammals.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Gênero *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família Sicariidae, subordem Labidognatha, ordem Araneae, classe Arachnida e filo Arthropoda (Platnick, 2016). São popularmente conhecidas como aranhas-marrons dada sua coloração variar de marrom claro até marrom escuro, ou também como aranhas-violino por possuírem uma mancha que se assemelha ao desenho de um violino no cefalotórax (Futrell, 1992). Tais aranhas possuem uma distribuição mundial, com mais de 100 espécies já descritas em vários países da Europa, África, Oceania, partes da Ásia, América do Norte, América Central e, principalmente, da América do Sul (Gertsch e Russell, 1975; Da Silva *et al.*, 2004); (Platnick, 2016). Possuem um corpo que varia de 8 a 15 mm e suas pernas chegam a medir 30 mm de comprimento, possuem seis olhos brilhantes em semi-círculo sobre o cefalotórax, organizados em pares, apresentam dimorfismo sexual, sendo que os machos possuem corpo menor e pernas maiores que as fêmeas. (Bücherl, 1972).

As aranhas do gênero *Loxosceles* são sedentárias, têm hábitos noturnos e, diferente de outros artrópodes e ofídios, não são agressivas. Constroem teias irregulares que parecem fios de algodão esfiapado, alimentam-se de pequenos insetos e se reproduzem facilmente, mesmo em ambientes desfavoráveis. Podem suportar temperaturas de 8°C a 43°C, e a maior ocorrência de acidentes com essas aranhas está nos meses quentes do ano (74% dos casos). Tanto os machos quanto as fêmeas são peçonhentos e podem sobreviver mais de 276 dias sem água ou alimento (Futrell, 1992; Malaque *et al.*, 2011; Vetter, 2011).

No Brasil, é relatada a ocorrência de onze espécies de *Loxosceles*, das quais quatro endêmicas do país (Tambourgi *et al.*, 2010; Platnick, 2016). No Paraná, foram descritas quatro dessas espécies, sendo que a *L. intermedia* se mostrou a mais abundante, seguida da *L. gaucho*, *L. laeta* e *L. hirsuta* (Marques-Da-Silva e Fischer, 2005). As aranhas-marrons são conhecidas pelos acidentes que causam principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país, onde as espécies com maior importância médica são *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* (Sezerino *et al.*, 1998); (Malaque, 2002); (Da Silva *et al.*, 2004). Dentre tais três espécies, a *L. intermedia* está relacionada com o maior número de acidentes no Estado do Paraná. No ano de 2014

houve um total de 7.448 casos de envenenamentos por picadas de aranhas-marrons registrados no Brasil, dos quais 4.321 casos ocorreram no Estado do Paraná (SISTEMA NACIONAL DE NOTIFICAÇÕES DE AGRAVOS MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2014). É sugerido que o fato da *L. intermedia* ser mais abundante no Estado está relacionado com características mais generalistas dessa espécie, no que diz respeito a condições ambientais como: variação de temperatura, umidade e altitude variadas. Elas também se locomovem mais do que outras espécies e tem facilidade de se adaptar a diferentes substratos (Marques-Da-Silva e Fischer, 2005).

## 1.2 Veneno Loxoscélico

O veneno das aranhas-marrons é uma mistura complexa essencialmente de peptídeos, proteínas e enzimas de baixa massa molecular (5-40 kDa) (Mota e Barbaro, 1995); (Da Silveira *et al.*, 2002); (Da Silva *et al.*, 2004); (Appel *et al.*, 2005), das quais as mais estudadas são as fosfolipases-D, hialuronidases, metaloproteases e serinoproteases (Futrell, 1992); (FEITOSA *ET AL.*, 1998); (VEIGA, DA SILVEIRA, *ET AL.*, 2000; VEIGA, FEITOSA, *ET AL.*, 2000); (YOUNG E PINCUS, 2001); (VEIGA, ZANETTI, BRAZ, *ET AL.*, 2001; VEIGA, ZANETTI, FRANCO, *ET AL.*, 2001); (Da Silveira *et al.*, 2002); (Da Silveira, Pigozzo, *et al.*, 2007; Da Silveira, Wille, *et al.*, 2007).

As fosfolipases-D (32-35 kDa), anteriormente denominadas de esfingomielinases-D, são as enzimas mais estudadas do veneno de aranha-marrom, devido ao fato de que elas sozinhas, nas formas nativas ou recombinantes, são capazes de reproduzir muitos dos efeitos desencadeados no envenenamento decorrentes da picada das aranhas-marrons em humanos, como a lesão dermonecrotica, bem como alterações de permeabilidade, hemólise, nefrotoxicidade e agregação plaquetária *in vitro* (Da Silva *et al.*, 2004); (Appel *et al.*, 2005; Da Silveira *et al.*, 2006; Appel *et al.*, 2008; Kusma *et al.*, 2008; Chaves-Moreira *et al.*, 2009). Já foram descritas e testadas sete isoformas recombinantes de fosfolipases-D as quais compartilham similaridade entre as sequencias entre 55–99% principalmente na região do sítio catalítico. Entretanto, a análise transcriptômica da glândula produtora de veneno revelou que apenas 20,2% dos transcritos para toxinas de *L. intermedia* são codificantes para fosfolipases (Fig. 1) (Gremski *et al.*, 2014).

Uma família de enzimas também bem conhecida é a das metaloproteases, sendo que os primeiros estudos identificaram duas enzimas, denominadas Loxolisina

A, 20-28 kDa, que possui ação proteolítica sobre fibronectina e fibrinogênio, e Loxolisina B, 32-35 kDa, esta com atividade gelatinolítica (Feitosa *et al.*, 1998). Tais moléculas podem estar envolvidas nos distúrbios hemostáticos observados nos envenenamentos, tais como danos nos vasos sanguíneos e hemorragias na derme. Ademais, podem ser um fator de espalhamento para as demais toxinas do veneno devido sua ação sobre os componentes da matriz extracelular (Da Silveira *et al.*, 2002); (Zanetti *et al.*, 2002). As metaloproteases foram caracterizadas como pertencentes à família das Astacinas, portanto foram genericamente denominadas LALP (*Loxosceles Astacin-Like Protease*) (Da Silveira, Wille, *et al.*, 2007). Até o presente momento, sabe-se que existem mais duas isoformas de metaloproteases da família das astacinas no veneno de *L. intermedia* (LALP 2 e LALP 3) e pelo menos uma isoforma de astacina nos venenos de *L. laeta* e *L. gaucho* (LALP 4 e LALP 5, respectivamente), sugerindo que haja uma família de genes para astacinas possivelmente presente em todo o gênero *Loxosceles* (Trevisan-Silva *et al.*, 2010).

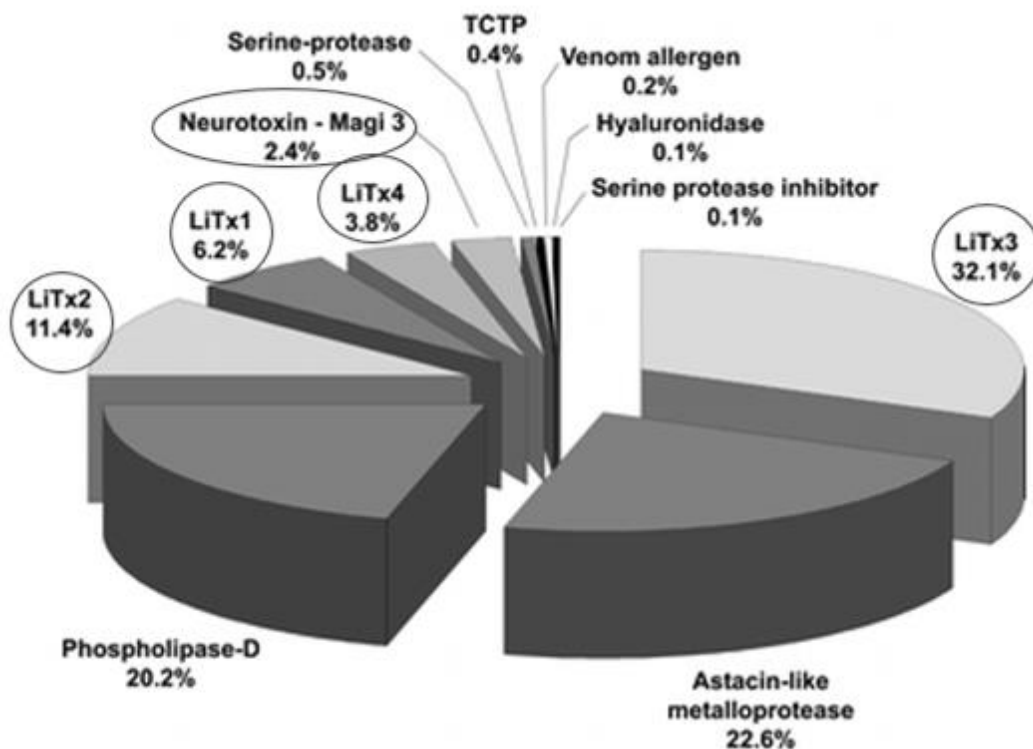


Figura 1. Quantidades relativas de transcritos de cada classe de toxina presente na glândula de veneno de *L. intermedia*. Círculos em vermelho denotam as classes de toxinas potencialmente inseticidas, que somadas representam mais de 50% do total de transcritos de toxinas. Adaptado de Gremski, *et al.* 2010.

Deve-se destacar também as hialuronidases, enzimas que degradam ácido hialurônico e condroitim-sulfato da matriz extracelular, que estão relacionadas ao espalhamento gravitacional característico no envenenamento por aranha-marrom, devido a desorganização das moléculas de matriz (Da Silveira, Chaim, *et al.*, 2007). Relata-se que pela degradação de glicosaminoglicanos, a matriz torna-se mais fluida facilitando o espalhamento das toxinas e mediadores secundários pelo organismo (Ferrer *et al.*, 2013; Gremski *et al.*, 2014). Interessantemente, representando apenas 0,1% dos transcritos para toxinas, as hialuronidases apresentam atividade biológica relevante no quadro de envenenamento, onde mostrou-se capaz de aumentar a lesão causada pela fosfolipase recombinante em pele de coelho (Ferrer *et al.*, 2013).

Outra toxina já caracterizada no veneno de *L. intermedia* foi a toxina da família da TCTP (*translationally-controlled tumor protein*), as quais são proteínas altamente conservadas em eucariotos, expressas em diferentes tipos celulares e tecidos (Sade *et al.*, 2012). O nome é devido ao fato de tal proteína ter sido primeiramente identificada em carcinoma mamário humano e ser regulada no nível traducional, essa proteína também estava associada a liberação de histamina (Bommer e Thiele, 2004). A TCTP encontrada no veneno de *L. intermedia* foi produzida recombinante e capaz de induzir edema de pata e aumento da permeabilidade vascular em camundongos (Sade *et al.*, 2012).

Por fim, toxinas inseticidas já foram identificadas no veneno de *L. intermedia*, sendo as primeiras descritas por (De Castro, Cibele Soares *et al.*, 2004) que por meio de uma série de cromatografias isolou três toxinas com atividade inseticida. Tais toxinas inseticidas são peptídeos com massas moleculares entre 5,6–7,9 kDa então denominados LiTx 1, LiTx 2 e LiTx 3 (ou U1-SCRTX-Lit1a, U1-SCRTX-Lit1b e U2-SCRTX-Lit1 segundo (King, Gentz, *et al.*, 2008). Todas essas toxinas, quando injetadas, foram capazes de causar paralise flácida em larvas de mariposa (*Spodoptera frugiperda*) levando-as à morte, porém não foram estabelecidos valores para PD<sub>50</sub> ou LD<sub>50</sub>. Análises filogenéticas baseadas em similaridade das suas sequências aminoacídicas e atividade biológica, relacionaram as toxinas aos peptídeos com ação sobre canais iônicos para sódio e cálcio, bem como foram classificadas como pertencentes à família das notinas (De Castro, C. S. *et al.*, 2004; Gremski *et al.*, 2010). Uma outra isoforma da U2-SCRTX-Lit1 chamada de U2-



SCRTX-Lit1b foi clonada e caracterizada como pertencente à família das notinas por Matsubara e colaboradores (2013), esse trabalho ainda mostrou por reações cruzadas entre anticorpos que as notinas estão presentes em *L. laeta* e *L. gaucho* (Matsubara *et al.*, 2013). Além das LiTx de 1 a 3 descritas anteriormente o transcriptoma da glândula produtora de veneno de *L. intermedia* demonstrou a existência da LiTx 4 da neurotoxina similar a Magi 3, ambas com potencial inseticida. Toxina semelhante a Magi 3 também foi encontrada no transcriptoma de *L. laeta* representando 0,2 % dos transcritos, porém outras toxinas inseticidas não foram anotadas nesse transcriptoma (Fernandes-Pedrosa Mde *et al.*, 2008). Quanto ao potencial inseticida de outras toxinas do veneno de *Loxosceles*, uma fosfolipase recombinante de *L. arizonica* teve sua atividade testada em grilos. Foi observado que ela é praticamente tão potente quanto o veneno bruto com PD<sub>50</sub>= 2,27 µg/g de inseto para o veneno e 2,55 µg/g para a fosfolipase. Tais resultados colocam essa fosfolipase como altamente inseticida, porém pouco se sabe sobre a contribuição relativa da fosfolipase na atividade inseticida (Zobel-Thropp *et al.*, 2012).

Assim como o transcriptoma de *L. laeta*, o transcriptoma de *L. intermedia* sugeriu a existência de uma classe de toxina semelhante a uma neurotoxina encontrada na aranha *Macrothele gigas*, chamada Magi 3 (µ-hexatoxin-Mg2a), a qual foi descrita por (Corzo *et al.*, 2003) (Fig. 2). A µ-hexatoxin-Mg2a possui ação sobre canais de sódio de insetos, causando parálise reversível, mas não apresentou toxicidade para mamíferos. A sequência semelhante à Magi 3 obtida no transcriptoma de *L. intermedia* foi então denominada de U2-SCRTX-Lit2, cuja clonagem e expressão heteróloga foram objetivos relacionados com a minha dissertação de Mestrado (Meissner, 2012). Adicionalmente, foram realizadas análises por ferramentas de bioinformática, nas quais foi revelada, em consequência dos dez resíduos de cisteína, a possível presença de cinco pontes dissulfeto, que classificam a U2-SCRTX-Lit2 como pertencente à família das notinas, também conhecida como família dos Nós de Cistina Inibidores (ICK) (Fig. 3) (Meissner, 2012). As toxinas inseticidas da família das notinas são peptídeos comumente encontrados nos venenos de aranhas, escorpiões e até mesmo em plantas (Dong, 2007), são peptídeos com baixa massa molecular variando de 2 a 12 kDa. Os venenos de aranhas apresentam uma maior concentração desses peptídeos do que os venenos de escorpião (Escoubas *et al.*, 2000). Essas toxinas são classificadas de acordo com

o seu modo de ação: elas podem afetar a transmissão glutamatérgica, bem como o fluxo de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ) ou cloreto ( $\text{Cl}^-$ ). Algumas toxinas podem estimular a liberação dos neurotransmissores e outras podem bloquear os receptores colinérgicos pós-sinápticos (Rash e Hodgson, 2002). O principal alvo dessas toxinas são os canais iônicos de células nervosas e proteínas de membrana envolvidas na liberação de neurotransmissores em células pré-sinápticas (Rash e Hodgson, 2002). Devido à importância dos canais iônicos na excitabilidade celular eles são frequentemente alvo de neurotoxinas como as notinas, essa ligação com os canais iônicos de células excitáveis afeta a funcionalidade dessas células de modo que podem levar a morte do organismo (King, Escoubas, *et al.*, 2008; Windley *et al.*, 2012).

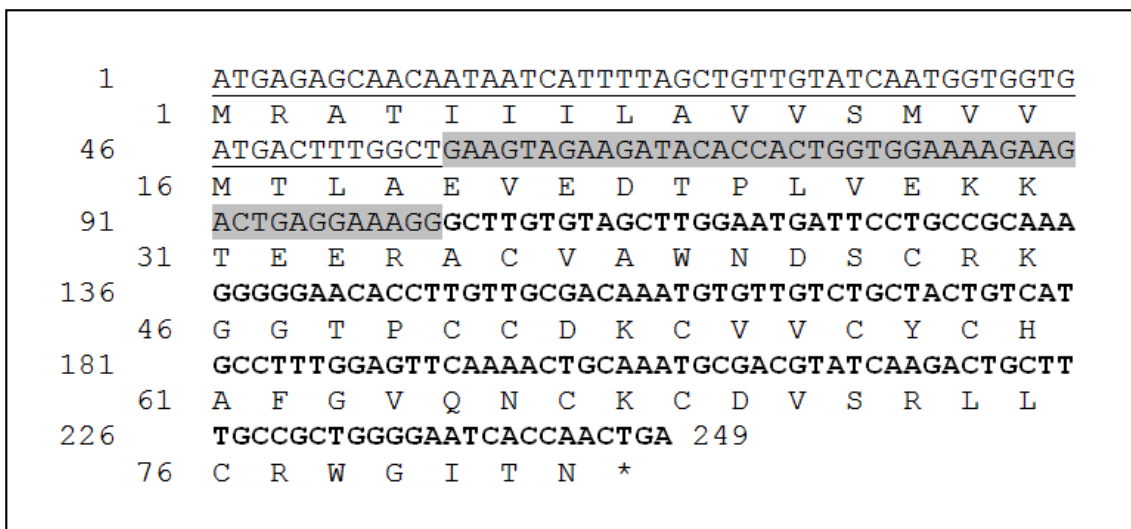


Figura 2. Sequências nucleotídica e aminoacídica correspondente obtidas no transcriptoma de *L. intermedia*. A toxina foi então obtida completa e clonada durante trabalho de Mestrado. A parte sublinhada corresponde ao peptídeo sinal, destacado em cinza o pró-peptídeo. Em negrito, a sequência codificante para o peptídeo maduro.

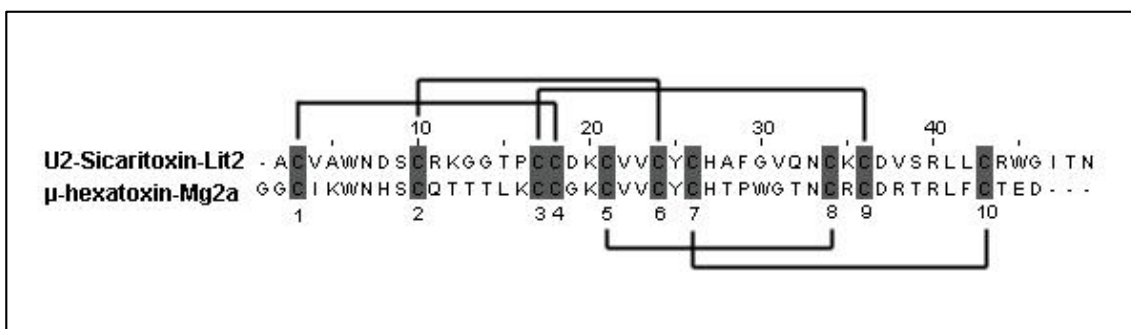


Figura 3. Alinhamento das sequências aminoacídicas maduras das U2-sicaritoxin-Lit2a e  $\mu$ -hexatoxin-Mg2a (Magi3). Na parte superior visualiza-se o padrão de ligação entre as cisteínas que formam o motivo estrutural nó de cistina inibidor. Na parte inferior, estão destacadas as duas pontes dissulfeto acessórias. Ambas toxinas apresentam o mesmo padrão predito de pontes dissulfeto.

### 1.3 Peptídeos Inseticidas Ricos Em Resíduos De Cisteína

Os peptídeos ricos em resíduos de cisteína podem ser divididos em 41 grupos de dobramentos diferentes, os quais estão então divididos em 98 famílias (Cheek *et al.*, 2006). Tais peptídeos geralmente apresentam menos de 70 aminoácidos em sua cadeia primária. Existem três grupos principais de peptídeos ricos em cisteínas que apresentam o motivo nó de cistina: o Nó de Cistina Inibidor “Inhibitor Cystine Knot” (ICK), o Nó de Cistina Cíclico “Cyclic Cystine Knot” (CCK) e o Fator de Crescimento Nó de Cistina “Growth Factor Cystine Knot” (GFCK) (Fig. 4) (Mcdonald e Hendrickson, 1993; Craik *et al.*, 1999; Daly e Craik, 2011). Esses grupos de peptídeos que apresentam o motivo nó de cistina (denominado cistina, pois é como se refere ao dímero oxidado de cisteína), podem ser encontrados em diferentes organismos tais como as toxinas dos venenos de artrópodes, moluscos e bactérias (ICK), plantas (CCK), e fatores de crescimento, hormônios e inibidores enzimáticos em mamíferos (GFCK).

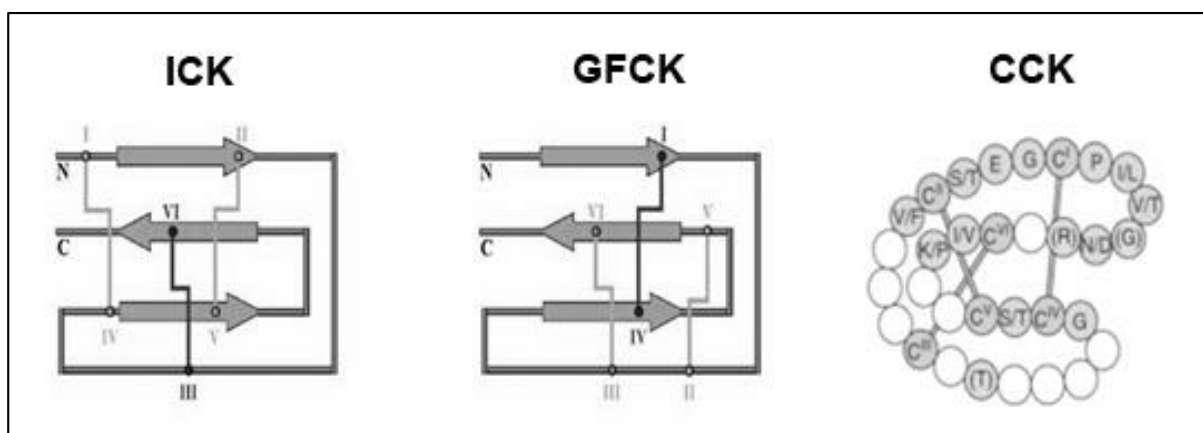


Figura 4- Representação esquemática dos três tipos de notinas. Na esquerda o motivo ICK mostrando como as pontes se inter cruzam. No centro, o motivo GFCK muito similar ao ICK, porém a maneira de entrelaçamento é diferente. Na direita representação do motivo CCK que apresenta o mesmo entrelaçamento dos ICKs, mas sua estrutura é cíclica com uma ligação peptídica entre as porções N e C terminais. Adaptado de (Gelly *et al.*, 2004; Gracy *et al.*, 2008)

Os ICKs e CCKs são estruturalmente semelhantes, diferindo apenas na estrutura cíclica dos CCKs (Fig. 4). As fontes mais comuns de ICK são os venenos de aranhas, escorpiões e caramujos, mas eles também podem ser encontrados em plantas e fungos (Daly e Craik, 2011). A estrutura básica do nó de cistina é composta por três folhas betas dispostas de maneira antiparalela e estabilizada por pontes dissulfeto. Duas pontes formam uma estrutura como um anel e uma terceira ponte

cruza essas duas formando o motivo nó de cistina geralmente o padrão de conexão das cisteínas é I-IV; II-V; III-VI (Fig 4). Se houver mais de três pontes dissulfeto elas são consideradas acessórias e não necessariamente participam do motivo estrutural. Entretanto, existe uma toxina de aranha (*Ornithoctonus huwena*) que foi descrita por apresentar dois motivos ICK na mesma molécula (Bae *et al.*, 2012). O ICK é motivo estrutural dominante nos peptídeos encontrados nos venenos de aranhas (King *et al.*, 2002).

Acredita-se que os ICKs tenham surgido de uma classe precursora de peptídeos que possuía duas folhas betas e duas pontes dissulfeto chamada de “ $\beta$ -hairpin” dirigido por pontes dissulfeto (DDH) (Wang *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2003). Até o presente momento, esse motivo estrutural foi descrito para um peptídeo encontrado no escorpião *Liocheles waigiensis*, chamado de U<sub>1</sub>-LITX-Lw1a (Smith *et al.*, 2011). Segundo o Knottin DataBase, o banco de dados online para notinas, até o presente momento existem descritas 2193 sequências de 450 organismos. Considerando todas as classes de notinas, as aranhas representam 775 destas sequências (Gracy *et al.*, 2008 Gelly, 2004 #163). Esses peptídeos apresentam uma enorme gama de funções e alvos celulares, mas sua principal atividade é modular a atividade de canais iônicos, eles podem se ligar a diferentes regiões dos canais ou ainda a canais de vertebrados e/ou invertebrados de maneiras específicas (Li *et al.*, 2003).

Os ICKs formam uma família estrutural de peptídeos que apresentam geralmente entre 6 a 14 resíduos de cisteína em sua estrutura primária, a qual muitas das toxinas inseticidas presentes em venenos animais pertencem. ICKs podem possuir até sete pontes dissulfeto, mas três se entrecruzam formando o motivo conhecido como nó de cistina inibidor (Fig. 3 e 4), esses peptídeos também são denominados de notinas - do inglês “knottins” (Gelly *et al.*, 2004; Gracy *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2012a). Peptídeos da família dos ICKs ou notinas são o motivo estrutural mais abundante em venenos de aranhas (King, 2011). A principal atividade biológica das notinas nesses venenos, é a atividade inseticida.

O grande número de resíduos de cisteína faz com que as notinas tenham muitas pontes dissulfeto, a presença das pontes dissulfeto confere às notinas uma estrutura terciária extremamente estável. Podem ser fervidas, incubadas a 65°C por semanas ou ainda podem ser colocadas em 1N de HCl ou NaOH sem perderem sua

conformação ou funcionalidade (Werle *et al.*, 2007); (Heitz *et al.*, 2008); (Kimura *et al.*, 2009). Algumas notinas são capazes de resistir à ação de proteases plasmáticas e intestinais (Werle *et al.*, 2006; Werle *et al.*, 2008; Herzig e King, 2015), podendo assim ser administradas por via oral o que facilitaria uma aplicação biotecnológica. Por exemplo, uma solução contendo essas toxinas poderia ser pulverizada sobre plantas de modo a eliminar insetos que se alimentassem dessa cultura. A aplicação contra pragas de interesse econômico já foi testada, onde as notinas de aranhas  $\delta$ -amaurobitoxin-PI1a ou  $\omega$ -hexatoxin-Hv1a foram fusionadas à uma lectina de *Galanthus nivalis* (GNA) e tiveram suas atividades testadas em afídeos resistentes a piretróides. A GNA auxilia a absorção da toxina pelo intestino do inseto, fazendo com que ela passe para a hemolinfa mais facilmente. Essa estratégia aumentou a LD<sub>50</sub> de 2 à 6 vezes para a construção contendo a  $\delta$ -amaurobitoxin-PI1a (Yang *et al.*, 2015). Outro resultado interessante obtido com a construção contendo a  $\omega$ -hexatoxin-Hv1a foi que ela se demonstrou um agente inseticida específico para pragas, e sem atividade sobre abelhas que são agentes polinizadores que devem ser mantidos no ambiente (Nakasu *et al.*, 2014).

ICKs também podem ser divididas pelo modo de ação, como sendo bloqueadoras do poro do canal iônico ou modificadoras das propriedades de abertura do canal (“gate modifiers”). Essa diferença está associada à região do canal que a toxina se liga, se ela se ligar na região do filtro de seletividade ela é uma bloqueadora (Lewis e Raman, 2013). As Modificadoras normalmente se ligam na região das alças transmembranas e afetam a física de abertura, inativação ou fechamento do canal (Peretz *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2014).

Grande parte das notinas possuem atividade sobre canais de sódio voltagem-dependente (Nav). Os canais de sódio possuem papel fundamental na geração e propagação do potencial de ação, isso os torna um ótimo alvo para novas drogas como analgésicos, antiarrítmicos e anticonvulsivos (King e Vetter, 2014; Bagal *et al.*, 2015). Para mamíferos já foram descritas a existência de nove subtipos de Nav, nomeados de Nav 1.1 à 1.9, e esses apresentam uma distribuição diferente em diferentes tecidos (Catterall *et al.*, 2005; King e Vetter, 2014). Dos canais envolvidos na nocicepção, os principais são os Nav 1.7, 1.8 e 1.9, com especial destaque para Nav 1.7 que atua como um amplificador do sinal de dor (King e Vetter, 2014). Esse

canal foi descrito como importante na sinalização de dor através de estudos, onde pessoas com deficiência no gene SCN9A que codifica o canal Nav 1.7 possuem uma insensibilidade congênita a dor (Dib-Hajj *et al.*, 2013). Tais indivíduos não apresentavam nenhuma deficiência motora, autonômica, de tato, temperatura ou propriocepção, apenas apresentavam anosmia, que é a incapacidade de sentir odores (Dib-Hajj *et al.*, 2013). De tal modo que a participação fundamental do Nav 1.7 torna-se um alvo muito interessante para a descoberta de novos analgésicos.

Os peptídeos da família das notinas vem sendo cada vez mais estudados como possíveis novos inibidores específicos para os canais Nav. Klint e colaboradores 2015 fizeram uma procura em larga escala por inibidores de Nav 1.7 em venenos de aranha, onde testaram 205 venenos e encontraram pelo menos uma molécula inibidora em 40% dos venenos. Dos peptídeos encontrados foram caracterizados sete novos peptídeos inibidores incluindo sequência, massa molecular e predição do padrão de pontes dissulfeto e estrutura tridimensional, isso mostra como os venenos de aranha são uma rica fonte de moléculas inibidoras de canais de sódio com potencial para desenvolvimento de novos analgésicos (King, 2011; Klint *et al.*, 2015).

Outro alvo comum para ICKs são os canais de Cav, eles são essenciais na liberação de neurotransmissores, secreção de hormônios e excitação e contração de células (Catterall, 2011; Klint *et al.*, 2014). Esses canais também podem ser bons alvos para tratamento de algumas doenças como epilepsia, enxaqueca e hipertensão (Vink e Alewood, 2012; Pietrobon, 2013). Os canais de cálcio em mamíferos são divididos em subtipos L, N, P, Q, R e T de acordo com suas propriedades farmacológicas e eletrofisiológicas (Zamponi *et al.*, 2015). Dependendo da subunidade alfa que os compõem, eles podem ser classificados como Cav1, Cav2 e Cav3, os quais ainda são subdivididos, classificação essa que permeia a classificação anterior. Por exemplo, os Cav1 estão no subtipo L, os Cav2 compreendem os subtipos P, Q, N e R; os Cav3, o subtipo T. Os Cav2 são sensíveis a toxinas de aranhas e caramujos marinhos, já os Cav3 são mais sensíveis a toxinas de escorpiões como kurtoxina e  $\beta/\omega$ -TRTX-Tp1a (ProTxI) e  $\beta/\omega$ -TRTX-Tp2a (ProTxII) de tarântulas (Chuang *et al.*, 1998; Middleton *et al.*, 2002; Ohkubo *et al.*, 2010). Devido ao fato dos Cav2.2 estarem relacionados com a transmissão do sinal de dor pela espinha, eles são um bom alvo para desenvolvimento de novas drogas analgésicas (Rahman *et al.*, 2015). O Ziconotide (Prialt®) é um análogo sintético do peptídeo  $\omega$ -conotoxin MVIIA

encontrado no veneno do caramujo *Conus magnus*, é umas das poucas drogas eficientes no tratamento de dor crônica, mas ainda tem seu uso limitado devido a administração ser intratecal e aos sérios efeitos colaterais que causa (Duggan e Tuck, 2015).

Dada a relevância biológica e características físico-químicas dos peptídeos da família das notinas, esse trabalho visou a obtenção recombinante de toxinas com potencial atividade inseticida presentes no veneno de *L. intermedia*. Para tanto, foram realizadas técnicas de biologia molecular, utilizando-se da expressão e sistemas procarióticos e eucarióticos para obtenção das toxinas recombinantes para fins de caracterização funcional e estrutural.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Caracterização funcional e estrutural de toxinas recombinantes da família das ICKs com potencial inseticida presentes no veneno de aranha-marrom (*L. intermedia*).

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Produção e obtenção das toxinas recombinantes da família das ICKs em sistemas heterólogos
- Determinação das atividades biológicas das toxinas recombinantes tipo ICK obtidas;
- Determinação da estrutura tridimensional das toxinas recombinantes tipo ICK obtidas.



### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Clonagem da U2-SCRTX-Lit2 em vetores de expressão de *E. coli*

A clonagem da sequência codificante da toxina foi realizada em diferentes vetores de expressão com o intuito de otimizar a produção de toxina solúvel e na sua forma ativa. Para isso a toxina foi clonada em vetores como pET-32a (Novagen, Darmstadt, Germany) oligo nucleotideo iniciador *sense* pET-32a 5'- AAT GGA TCC GAA GTA GAA GAT ACA C - 3' (*Bam*HI). pET-SUMO (Life Technologies, USA) oligo nucleotideo iniciador *sense* pET-SUMO 5'- GAA GTA GAA GAT ACA CCA CTG -3'. O vetor pET-20b (Novagen, Darmstadt, Germany) oligo nucleotideo iniciador *sense* pET-20b 5'- ATG GAT CCT GAA GTA GAA GAT ACA C -3' (*Bam*HI). Oligos nucleotideos iniciadores *antisense* 5'-AAT CTC GAG TCA GTT GTT GAT TCC- 3' (*Xho*I) para pET-32a e pET-SUMO e 5'- AAT CTC GAG GTT GTT GAT TCC- 3' (*Xho*I) para pET-20b. As clonagens foram feitas com enzimas de restrição e ligação de acordo com instruções dos fabricantes.

#### 3.2 Transformação para expressão da U2-SCRTX-Lit2 em bactéria

Para a expressão da toxina foi realizada uma purificação de plasmídeos através de minipreparação das diferentes construções com o kit Wizard plus (Promega). Os plasmídeos obtidos foram introduzidos em diferentes cepas de expressão de *E. coli* quimiocompetentes, são elas: BL21(DE3) STAR (Novagen, Darmstadt, Germany) deficiente em RNase E citoplasmática. AD494 (Novagen, Darmstadt, Germany) é uma cepa que favorece a formação de pontes dissulfeto, pois é deficiente em uma tioredoxina. Shuffle T7 Express lysY (New England Biolabs) também favorece pontes dissulfeto por ser deficiente em tioredoxina e glutaredoxina e ainda possui uma chaperona no citoplasma que ajuda no correto dobramento das proteínas expressas. Rosetta-gami (Novagen, Darmstadt, Germany) que além de favorecer a formação de pontes dissulfeto ainda possui tRNAs para códons raros em *E. coli* o que favorece a síntese de algumas proteínas de eucariotos. Uma alíquota de solução de bactérias das cepas de *E. coli* (100 µl) foram retiradas do freezer -80°C e mantidas em gelo. Quando descongeladas, foram adicionados 1µl de cada construção para cada bactéria, a mistura foi homogeneizada e colocada em gelo por 30 minutos, depois a 42°C 90 segundos e gelo novamente por mais 90 segundos. As

bactérias foram recuperadas em meio SOC (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM e glicose 0,2 M) e incubadas por uma hora sob moderada agitação (aproximadamente 100 rpm), a 37°C em agitador do tipo shaker. Após o período de recuperação as bactérias foram plaqueadas em duas placas diferentes para cada construção, contendo meio LB ágar (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 10 g/L, agar-ágar 15 g/L) suplementado com os devidos antibióticos para cada bactéria, uma das placas recebeu 100 µl da suspensão bacteriana e a outra recebeu o equivalente aos 900 µl restantes. O plaqueamento foi realizado com alça de Gauss estéril e as placas foram incubadas a 37°C em incubadora do tipo B.O.D. modelo 411 D (Nova Ética), por 16 h.

### **3.3 Testes de miniexpressão da U2-SCRTX-Lit2**

Para o teste de expressão da toxina foram feitos pré-inóculos para cada cepa com os diferentes vetores, com 5 mL de meio Triptona fosfato (2% triptona, 0,2% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,8% NaCl, 1,5% extrato de levedura e 0,2% de glicose), colocado para crescer a 37°C em um agitador a 200 rpm por 16 horas. Os inóculos foram feitos diluindo-se os pré-inóculos (1:50) em frascos de cultura de 500 mL, em volume total de 125 mL. As culturas foram monitoradas até atingirem densidade ótica (DO<sub>550</sub>) entre 0,4 e 0,6 (fase log). As induções das expressões foram feitas à 30°C inicialmente. A indução foi feita pela adição de IPTG em três diferentes concentrações: 0,1; 0,4 e 1,0 mM e amostras das culturas foram coletadas a cada hora. As amostras das diferentes condições de indução foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 18%, para verificar qual condição de expressão, cepa e vetor foi melhor para realizar a expressão em larga escala.

### **3.4 Expressão da U2-SCRTX-Lit2**

Para expressão da toxina foi feito um pré-inóculo com 10 mL de meio triptona fosfato, colocado para crescer a temperatura correta em um agitador a 200 rpm por 16 horas. O inóculo foi feito diluindo-se o pré-inóculo 1:50, em frasco de cultura de 2000 mL, em volume total de 1000 mL e a cultura foi monitorada até atingir densidade ótica (DO<sub>550</sub>) entre 0,4 e 0,6. A indução da expressão é feita à 30° C pela adição de IPTG na concentração a ser padronizada. Após o tempo de indução a cultura foi então resfriada em banho de gelo e centrifugada a 4000 g por 5 minutos (Sambrook, 2001).

O precipitado bacteriano foi ressuspenso em 20 mL de tampão de ligação para resina Ni-NTA agarose (Qiagen) e adicionado 1 mg/mL de lisozima (Sigma), incubado por 30 minutos em banho de gelo, e então, congelado a -20°C onde foi mantido até o momento da lise mecânica. Após descongelamento, as bactérias foram lisadas por sonicação em 8 ciclos de 25 segundos em potência 500 W. O lisado foi centrifugado por 30 minutos a 9000 g para separação da fração solúvel da insolúvel, sendo a fração solúvel submetida à purificação (Qiaexpressionist, 2003).

### **3.5 Purificação da U2-SCRTX-Lit2 recombinante**

Os sobrenadantes foram submetidos à cromatografia de afinidade, utilizando uma resina Ni-NTA agarose, para a purificação das proteínas recombinantes contendo a etiqueta de histidinas. A ligação da toxina recombinante foi feita por 1 hora a 4°C sob leve agitação constante. A resina foi retirada do sobrenadante e colocada em coluna de purificação, essa coluna foi lavada exaustivamente em tampão de lavagem (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM) e eluída no mesmo tampão contendo 250mM de imidazol. As frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE, reunidas e dialisadas contra PBS (NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4), por três banhos, o primeiro de 1 hora seguidos por mais um de 2 horas e o terceiro de 16 horas, contendo volume de PBS 100 vezes maior que o eluído de toxina. Os três banhos da diálise foram feitos a 4°C.

### **3.6 Quantificação de conteúdo proteico**

A quantificação das amostras de toxinas recombinantes foi realizada pelo método do Azul de Coomassie descrito por BRADFORD (1976) e adaptado para microensaio em espectrofotômetro, o que reduz o gasto de proteína no momento da dosagem e aumenta a sensibilidade do método. O padrão de proteína utilizado para a dosagem foi albumina soro bovina (BSA). As reações colorimétricas foram realizadas em placa de 96 poços e a absorbância medida em leitor de placa (Meridian ELX 800) com filtro 595nm.

### **3.7 Produção de anticorpos policlonais que reconheçam a U2-SCRTX-Lit2 recombinante**

Foram utilizados dois coelhos Neozelandeses para as imunizações, os quais foram imunizados com a toxina purificada e foram mantidos no biotério da Pontifícia

Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), com água e comida a vontade. Foram realizadas imunizações a cada 21 dias em um total de quatro imunizações por animal, utilizando adjuvante completo de Freund (Sigma) na primeira aplicação e nos reforços seguintes, adjuvante incompleto de Freund (Sigma) na proporção 1:2 (v/v). A emulsão que foi injetada nos animais continha 50 µg de toxina diluída em PBS para volume final de 150 µl e adicionados 150 µl de adjuvante. Os 300 µL da emulsão foram divididos em três pontos: dois intramusculares e um subcutâneo em cada animal; (Harlow e Lane, 1988b). A utilização de animais foi feita após a aprovação de projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) UFPR número 743.

### **3.8 Western Blotting (W.B.)**

Para ensaios de especificidade dos anticorpos foram realizados “Western Blotting”. Amostras de 5µg de toxina foram submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 20% (SDS-PAGE) e as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose por 16 horas a 25 V. Em seguida as membranas são bloqueadas por 1 hora com leite desnatado em pó diluído em PBS 3% (p/v). Os soros dos animais diluídos na mesma solução de bloqueio ou anticorpo Anti-His Antibody (GE, healthcare) são usados como anticorpos primários em diferentes diluições. Anti-His Antibody 1:3000, soro 1:1000; 1:2000; 1:4000; 1:8000; 1:16000; 1:32000 e 1:64000. São incubados por 2 horas à temperatura ambiente e sob constante agitação. As membranas foram lavadas com o mesmo tampão na ausência de anticorpo e incubadas com anticorpos secundários imunoglobulinas G de cabra anti-IgG de camundongos conjugadas com fosfatase alcalina (Sigma) por 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagens, a reação é revelada com o substrato BCIP e o cromógeno NBT (Promega) em tampão ótimo para atividade de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM e MgCl 5 mM) adaptado de (Harlow e Lane, 1988a).

### **3.9 Ensaio de paralise em insetos**

Foram utilizados grilos, baratas, abelhas e larvas de mosca para esses testes. Uma solução contendo a toxina em diferentes concentrações foi injetada entre o segundo e o terceiro par de pernas para os grilos e baratas. Para as abelhas a injeção foi feita na porção superior dorsal do tórax. Enquanto que para as larvas de mosca foi injetado entre o terceiro e quarto segmento da porção anterior na parte ventral. Essas regiões foram escolhidas pois o sistema nervoso desses animais se encontra mais

periférico nessas regiões e pode ser mais facilmente atingido. Foram usados três grupos com cinco animais para cada teste e no grupo controle foi injetado apenas água. Os animais foram observados em intervalos de tempo após a injeção, animais mortos foram descartados. (Escoubas *et al.*, 1995).

### **3.10 Clonagem da sequência codificante de U2-SCRTX-Lit2 em vetor pPICZαC.**

A sequência codificante foi extraída a partir da construção U2-sicaritoxin-Lit2-pET-32a com oligos nucleotídeos iniciadores específicos: sense 5'- GAA TCG ATGGAA GTA GAA GAT ACA C-3'; antisense 5'- TA TCT AGA CC GTT GGT GAT TCC CCA-3' com sítios de restrição para Clal e XbaI sublinhados respectivamente. A clonagem foi realizada em vetor pPICZαC com enzimas de restrição e ligação de acordo as recomendações dos fabricantes. As construções U2-sicaritoxin-Lit2/pPICZαC foram transformadas na cepa de clonagem de *E. coli* TOP10F' (Invitrogen) por eletroporação. A eletroporação foi efetuada com o auxílio do aparelho Gene Pulser X-Cell® (Bio-Rad). Após a transformação as bactérias foram ressuspensas em meio LB *low-salt* (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 5g/L) e incubadas a 37°C por 1 hora sob rotação de 200rpm, constituindo a fase de recuperação. Após, a seleção dos clones foi realizada em placas contendo meio LB-ágar *low-salt* (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 5g/L, agar-ágar 15g/L) suplementado com zeocina (25µg/mL) (Invitrogen) e tetraciclina (10µg/mL) (Invitrogen). Otimização da sequência para expressão em *P. pastoris* e clonagem da sequência com pró-peptídeo em vetor pPICZαC realizados pela empresa GenScript USA inc. (Piscataway, NJ)

### **3.11 Transformação e expressão das construções U2-sicaritoxin-Lit2/pPICZαC em cepas de *Pichia pastoris*.**

As construções foram transformadas nas cepas X-33 (selvagem), GS115 (deficiente para produção de histidina), KM71H (Mut<sup>s</sup> Obrigatória) e SMD1168H (deficiente em protease A) utilizando o “*Pichia* easycomp transformation Kit” (Invitrogen) de acordo com as instruções. Primariamente, foram realizados testes de mini-expressão, os clones transformantes foram escolhidos ao acaso para a expressão. Colônias isoladas de *P. pastoris* (Invitrogen) contendo a sequência integrada ao cromossomo foram utilizadas para inocular 25mL de meio BMGY

(peptona 2%; extrato de levedura 1%; fosfato de potássio 100mM, pH 6,0; YNB 1,34%; biotina  $4 \times 10^{-5}$  %; glicerol 1%), sendo cada cultura incubada por 16-20 horas a 30°C sob agitação de 200 rpm até atingir absorvância em  $DO_{600}=2-6$ . As células foram recuperadas por centrifugação por 5 minutos a 4000xg a temperatura ambiente. A fase solúvel da centrifugação foi descartado e as células precipitadas ressuspendidas em 100mL de meio BMMY (peptona 2%; extrato de levedura 1%; fosfato de potássio 100mM, pH 6,0; YNB 1,34%; biotina  $4 \times 10^{-5}$ %; metanol 0,5%). A indução da expressão da proteína recombinante foi realizada através da incubação das culturas por 96 horas a 30°C sob agitação de 200rpm. A indução foi mantida pelo acréscimo de metanol absoluto para uma concentração final de 0,5% a cada 24 horas de incubação, de modo a compensar a perda do indutor por evaporação. Após este período as culturas foram centrifugadas por 5 minutos a 4000 g a temperatura ambiente. As proteínas presentes na fase solúvel de cada cultura foram submetidas à precipitação pela adição de sulfato de amônio a 90% de saturação seguida de centrifugação por 20 minutos a 9000 g a 4°C. Os precipitados obtidos após a centrifugação foram ressuspendidos em 2mL de tampão fosfato (fosfato de sódio 50mM, pH 7,4, cloreto de sódio 500mM), com posteriores diálises contra o mesmo tampão. A série de diálises foi composta por duas etapas de 2 horas, seguida de uma etapa de 16 horas, a 4°C. Após as diálises, a cada amostra foi adicionado imidazol para concentração final de 10mM, visando a posterior ligação em resina de Ni-NTA Agarose (Qiagen).

### **3.12 Teste de expressão da U2-sicaritoxin-Lit2 em *Pichia Pastoris* em alta densidade de células**

Foram crescidos pré-inóculos de 25 mL em erlenmeyers de 125 mL por 16-24h à 30°C em meio BMGY. Depois as células foram passadas para 100 mL de BMGY em erlenmeyers de 500 mL por mais 48h. Após o crescimento as culturas foram centrifugadas 3000g 5 min e as células foram ressuspendidas em 100 mL de meio BMMY contendo 1% metanol para induzir a expressão, sendo adicionados metanol absoluto a cada 24h para manter 1% por 3 dias. Ao final dos três dias de expressão, as culturas foram centrifugadas e o meio de cultura coletado para purificação da toxina. A fim de definir qual clone apresentava a melhor expressão os sobrenadantes das culturas foram precipitados com sulfato de amônio 80% e centrifugados à 9000g por 30 min. O precipitado de proteínas foi ressuspendido em tampão de ligação em resina Ni-NTA agarose e dialisado contra o mesmo tampão para retirar o excesso de

sulfato de amônio e realizar a ligação da toxina a resina. Após a purificação em resina de Ni-NTA a toxina foi dosada por Bradford e sua pureza avaliada em SDS-PAGE 18%.

### **3.13 Western blotting de colônia de *Pichia pastoris***

As colônias foram crescidas sobre uma membrana de nitrocelulose que foi colocada sobre o meio sólido para expressão BMGY-ágar. Esse sistema foi montado em uma microplaca de 96 pocos e metanol absoluto foi adicionado na tampa da placa a cada 24h para concentração final de 1% (v/v) a expressão foi realizada por 3 dias. Após esse período a membrana foi tratada com o tampão de lise (100 mM Tris pH 8.5, 20 mM EDTA, 9 M urea, 2% SDS, 150 mM  $\beta$ -mercaptoetanol), foram usados o anticorpo anti-Histag como primário e anticorpo anti-IGg de camundongo conjugado com fosfatase alcalina. O Western blotting foi conduzido como descrito anteriormente.

## **3. Materiais e Métodos doutorado sanduíche**

### **3.14 Obtenção das sequência e expressão heteróloga da U2-SCRTX-LIT2**

A sequência da U2-SCRTX-LIT2 que já vinha sendo trabalhada teve os códons otimizados e foi clonada no vetor pLIC-MBP (GE Lifescience). Para expressão da U2-SCRTX-LIT2 recombinante, os plasmídeos foram transformados em *E. coli* BL21(DE3), e expressão realizada em meio LB. As culturas foram crescidas até D.O.<sub>600</sub> = 0,8 a 37°C, 0,25 mM de IPTG foi adicionado e mantido a 16°C por 16 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 5000 g por 10 min, ressuspendidas em tampão para purificação (Tris 30 mM; NaCl 300 mM; pH 8,0) e lisadas usando disruptor de células a 27 kPa (TS Series Cell Disrupter, Constant Systems Ltd, Daventry, UK). O lisado foi centrifugado a 12000 g por 30 min para separar a fase solúvel da insolúvel.

### **3.15 Purificação da U2-SCRTX-LIT2**

Os sobrenadantes foram submetidos à cromatografia de afinidade, utilizando uma resina Ni-NTA agarose, para a purificação da U2-SCRTX-LIT2 recombinante contendo a etiqueta de histidinas. A ligação da U2-SCRTX-LIT2 recombinante foi feita por 1 hora a 4°C sob leve agitação constante. A resina foi separada do sobrenadante e colocada em coluna de purificação, foi então lavada em tampão de lavagem (Tris 30 mM, NaCl 300 mM pH 8,0) e eluída no mesmo tampão contendo agora 250mM de imidazol. O produto obtido foi analisado por SDS-PAGE, reunidas e dialisadas a 4°C

contra tampão Tris (Tris 30 mM, NaCl 300 mM pH 8,0), por três banhos, o primeiro de 1 hora seguido por mais um de 2 horas e o terceiro de 16 horas, todos contendo volume de tampão Tris 100 vezes maior que o eluato de toxina. Para purificação da U2-SCRTX-LIT2 madura, a MBP foi clivada usando TEV em mesmo tampão da purificação contendo GSH/GSSG 0,4mM e 0,6 mM e 200 ug de TEV, em temperatura ambiente por 16 horas. Ao produto da clivagem foi adicionado 0,5% de ácido trifluoroacético, e purificado em cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC) usando coluna semipreparativa C4 250x10 mm RP-HPLC Aquasi, tamanho da partícula 5 µm, (Thermo scientific). Em gradiente para purificação parcial 20-45% solvente B (0.043% ácido trifluoroacético em 90% acetonitrila) em solvente A (0.05% ácido trifluoroacético em água).

### 3.16 Subclonagem e expressão da U2-SCRTX-Lit1b

A sequência codificante para U2-SCRTX-Lit1b foi subclonada em vetor pLIC-MBP usando como oligonucleotídeo iniciador sense sublinhado o sítio de restrição para *Kpn* I e em itálico região codificante para sítio de clivagem da TEV protease:

5` - G GGT ACC *GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGA* TGC ATT AAA TCT G-3'

Como oligonucleotídeo antisense, sublinhado sítio de restrição para *Sac* I e em itálico códon duplo de parada.

5` - GCC GAG CTC *TTA TTA* ACC TTT TGT TCT -3 Para a expressão, a construção foi transformada em *E. coli* BL21(DE3) e realizada em meio LB. As culturas foram cultivadas até D.O.<sub>600</sub>=0,8 a 37°C, 0,5 mM de IPTG foi adicionado e mantido a 30°C por 4 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 5000 g por 10 min, ressuspensas em tampão para purificação (Tris 30 mM; NaCl 300 mM; pH 8,0) células lisadas usando disruptor de células a 27 kPa (TS Series Cell Disrupter, Constant Systems Ltd, Daventry, UK). O lisado foi centrifugado a 12000 g por 30 min para separar a fase solúvel da insolúvel. A expressão do peptídeo marcado com N<sup>15</sup> e C<sup>13</sup> para RMN foi adaptada de Marley 2001.

### 3.17 Purificação da U2-SCRTX-Lit1b

Purificação em resina de níquel feita como descrita anteriormente item 3.13. Para a purificação da U2-SCRTX-Lit1b madura, a MBP foi clivada usando enzima TEV em mesmo tampão da purificação contendo GSH/GSSG 3,0 mM e 0,3 mM, além de 200 µg de TEV, em temperatura ambiente por 16 horas. Ao produto da clivagem foi adicionado 0,5% de ácido trifluoroacético, e purificado em RP-HPLC usando



coluna semipreparativa C18 250x10 mm RP-HPLC C18 Aquasi, tamanho da partícula 5  $\mu\text{m}$ , (Thermo Scientific) gradiente para purificação parcial 20-45% solvente B (0.043% ácido trifluoroacético em 90% acetonitrila) em solvente A (0.05% ácido trifluoroacético em água), esse produto foi repurificado em coluna VisionHT HILIC 150x4.6mm 5 $\mu$  (Grace), gradiente 95-75% solvente B (0.043% ácido trifluoroacético em 90% acetonitrila) em solvente A (0.05% ácido trifluoroacético em água). RP-HPLC analítico e ESI-MS (espectrometria eletrospray) foram utilizados para confirmar a pureza. A toxina U2-SCRTX-Lit1b foi liofilizada e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso.

### **3.18 Teste de atividade biológica das toxinas recombinantes em moscas**

As toxinas U2-SCRTX-Lit1b, U1-SCRTX-Lit1a e U1-SCRTX-Lit1b foram ressuspendidas em solução salina de insetos e injetada em moscas varejeiras de carneiro (*Lucilia cuprina*) em diferentes doses (moscas obtidas através do departamento de agricultura, pesca e floresta de Brisbane). As moscas foram sedadas baixando sua temperatura com gelo seco e a injeção foi feita na região ventro-lateral, as moscas foram mantidas individualmente em tubos de 2 mL e avaliadas em tempos de 1 e 24; 48; 72h quanto aos efeitos. Os experimentos foram feitos em triplicata com seis concentrações e 10 moscas por grupo. Controle com solução salina foram usadas 20 moscas,  $\text{PD}_{50}$  foi calculada como descrito em (Herzig e Hodgson, 2008).

### **3.19 Ensaio eletrofisiológico em *Fluorometric Imaging Plate Reader* (FLIPR)**

Para avaliar a capacidade das toxinas de inibir a atividade de canais de cálcio e sódio humanos foram usadas células de neuroblastoma humano, linhagem SH-SY5Y mantidas a  $37^{\circ}\text{C}$  em incubadora com 5% de  $\text{CO}_2$  e em meio RPMI suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB) e 2mM de L-glutamine. Foram plaqueadas 40.000 células por poço em placa preta com fundo transparente (Corning) mantidas por 48 horas em estufa. O meio foi removido e aplicado 20  $\mu\text{L}$ /poço de corante cálcio 4 (Molecular Devices) em tampão 140 mM NaCl, 11,5 mM glucose, 5,9 mM KCl, 1,4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1,2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1,8 mM  $\text{CaCl}_2$ , e 10mM HEPES (pH 7,4); incubado em estufa  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min. Para análise sobre canais de cálcio 1 dependente de voltagem ( $\text{Cav}1$ ), 1  $\mu\text{M}$   $\omega$ -conotoxin CVID (bloqueadora de  $\text{Cav}2.2$ ) foi adicionada ao corante, e para  $\text{Cav}2.2$ , 10  $\mu\text{M}$  nifedipina (bloqueadora de  $\text{Cav}1$ ) foi adicionada ao corante. Para os canais de sódio, foi usado o mesmo protocolo com corante vermelho cálcio e ativador veratridina 50  $\mu\text{M}$ . As toxinas foram

incubadas por 15 minutos com as células em diluições seriadas 1:2 de 500,00  $\mu\text{M}$  até 0,12  $\mu\text{M}$ , após isso o ativador de cada canal (KCl 90 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM) foi adicionado gerando uma fluorescência medida pelo equipamento. Como controle positivo são usados apenas os inibidores de cada canal sem os ativadores. Para o controle negativo são usados os ativadores sem os inibidores. Os dados gerados foram analisados para determinar a  $\text{IC}_{50}$  de cada toxina.

### **3.20 Determinação da estrutura da U2-SCRTX-Lit1b por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

As frações obtidas no RP-HPLC da U2-SCRTX-Lit1b foram testadas quanto presença de conformação terciária usando *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC). A fração que apresentou dobramento e atividade biológica foi testada quanto a estabilidade em diferentes pHs para coleta de dados. Tampão citrato pH 3,45; acetato pH 5,0 e ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES) pH 6,0. A estrutura foi determinada usando RMN heteronuclear. A amostra continha 300  $\mu\text{L}$  de peptídeo marcado  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  a 300  $\mu\text{M}$  em tampão contendo 20 mM acetato de sódio e 5%  $\text{D}_2\text{O}$ , pH 5. Todos os espectros foram adquiridos à 298 K em espectrômetro Bruker Avance II+ 900 MHz equipado com probe criogênica (Bruker, Billerica, MA). Dados de ressonância foram obtidos usando (2D)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ - *heteronuclear single quantum coherence* (HSQC), 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC, 3D HNCACB, 3D CBCA(CO)NH, 3D HNCO, 3D HBHA(CO)NH, e 4D HCC(CO)NH-TOCSY, em cada espectro de 3D e quatro-dimensões foram adquiridos usando marcação não uniforme e transformados usando entropia máxima de reconstrução com o *Rowland NMR Toolkit* (<http://rnmrtk.uchc.edu/rnmrtk/RNMRTK.html>) como descrito anteriormente (Mobli *et al.*, 2007). Restrições das distâncias interprotons foram obtidas de 3D  $^{13}\text{C}$ -alifáticos,  $^{13}\text{C}$ -aromáticos, e  $^{15}\text{N}$  *nuclear Overhauser effect spectroscopy* (NOESY)-HSQC espectro adquirido usando tempo de mistura de 200 ms. Espectros foram analisados usando CcpNmr 2.4.1 (Vranken *et al.*, 2005). Restrições de ângulos de diedro foram derivados de Talos<sup>+</sup>, e programa de predição para ângulos de diedro do esqueleto da proteína (Shen *et al.*, 2009), com restrições de variação para cálculos da estrutura com o dobro da S.D. estimada. No espectro de NOESY os picos foram selecionados manualmente, a dinâmica dos ângulos de torção foram feitos com o pacote CYANA3 (Guntert, 2004) para assinalar posteriormente a lista de picos. Duzentas estruturas

foram calculadas no total e as 30 melhores foram selecionadas para análise final no CYANA ranqueados de acordo com sua qualidade estereoquímica como julgado pelo MolProbity (Chen *et al.*, 2010).

### **3.21 Obtenção das sequências e expressão U1-SCRTX-Lit1a e U1-SCRTX-Lit1b**

As sequências da U1-SCRTX-Lit1a e U1-SCRTX-Lit1b foram obtidas através do banco de dados do NCBI (Q6B4T5.1 e Q6B4T4.1). Os plasmídeos contendo as sequências sintéticas e com códons otimizados para expressão foram adquiridos comercialmente (GE Lifescience). Para ambas as sequências foi adicionada uma serina como primeiro aminoácido, isso permite uma maior eficiência na clivagem com a protease TEV. Para expressão, os plasmídeos foram transformados em *E. coli* BL21(DE3) e realizada em meio LB. As culturas foram crescidas até D.O.<sub>600</sub>= 0,8 a 37°C, 0,25 mM de IPTG foi adicionado e mantido a 16°C por 16 horas. Células foram coletadas por centrifugação a 5000 g por 10 min, ressuspensas em tampão para purificação (Tris 30 mM; NaCl 300 mM; pH 8,0) e lisadas usando disruptor de células a 27 kPa (TS Series Cell Disrupter, Constant Systems Ltd, Daventry, UK). O lisado foi centrifugado a 12000 g por 30 min para separar a fase solúvel da insolúvel.

### **3.22 Purificação da U1-SCRTX-Lit1a e da U1-SCRTX-Lit1b**

A purificação em resina de níquel foi feita como descrita anteriormente item 3.13. Para a purificação das toxinas maduras, a MBP foi clivada usando TEV em mesmo tampão da purificação (pH 7,0) contendo GSH/GSSG 0,4 mM e 0,6 mM e 200 ug de TEV, em temperatura ambiente por 16 horas. Ao produto da clivagem foi adicionado 0,5% de ácido trifluoroacético, e purificado em RP-HPLC usando coluna semipreparativa C4 250x10 mm RP-HPLC Aquasi, tamanho da particular 5 µm, (Thermo scientific) gradiente para purificação parcial 20-45% solvente B (0.043% ácido trifluoroacético em 90% acetonitrila) em solvente A (0.05% ácido trifluoroacético em água), esse produto foi repurificado em coluna VisionHT HILIC 150x4.6mm 5µ (Grace), gradiente 95-75% solvente B (0.043% ácido trifluoroacético em 90% acetonitrila) em solvente A (0.05% ácido trifluoroacético em água). RP-HPLC analítico e ESI-MS (espectrometria eletrospray) foi usado para confirmar a pureza. As toxinas purificadas foram liofilizadas e armazenadas a -20°C até o uso.

## 4 Resultados

### 4.1 Clonagem da U2-SCRTX-Lit2 em vetores de expressão para bactérias

A sequência codificante para toxina de interesse, obtida no transcriptoma da glândula produtora de veneno de aranha-marrom *L. intermedia* que havia sido clonada em pET-14b expressa em diversas cepas durante o trabalho de mestrado foi subclonada em novos vetores. Para o projeto de doutorado a sequência foi subclonada em três diferentes vetores de expressão: pET-20b, pET-32a e pET-SUMO. Para tanto foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores como mostrado na figura 3. Esses oligos foram utilizados na técnica de PCR utilizando como molde o clone da biblioteca de cDNA produzida por Gremski e colaboradores, 2010. Para os três casos o inserto foi obtido com sucesso através de PCR, esses produtos foram então submetidos à digestão com enzimas de restrição *Sac* I e *Xho* I para o pET-20b e as enzimas *Bam* HI e *Xho* I para o pET-32a. Já para o pET-SUMO, o vetor é vendido na sua forma linearizado, com timinas desapareadas em ambas as extremidades da molécula, portanto o produto do PCR teve suas extremidades 3' adeniladas pela *Taq* DNA polimerase, de modo a produzir extremidades coesivas entre o inserto e o vetor. Os produtos das digestões e da adenilação foram colocados para ligar com a enzima T4 DNA ligase por 16h a 16° C. Os resultados desses processos de clonagem são mostrados nas figuras 5, 6 e 7.

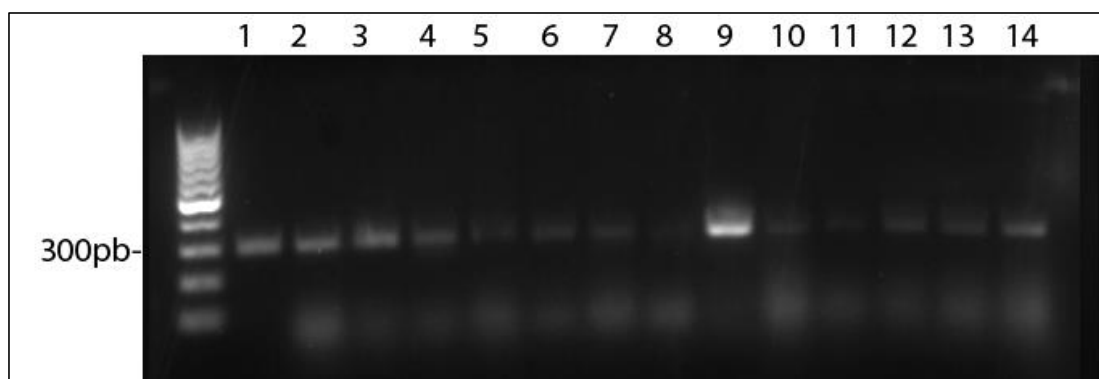


Figura 5. PCR DE COLÔNIA DA CLONAGEM EM pET-20b. Os quatorze clones testados possuíam o inserto ~300 pb. PCR feito utilizando-se o oligonucleotídeo iniciador *sense* específico e o *antisense* para o vetor.

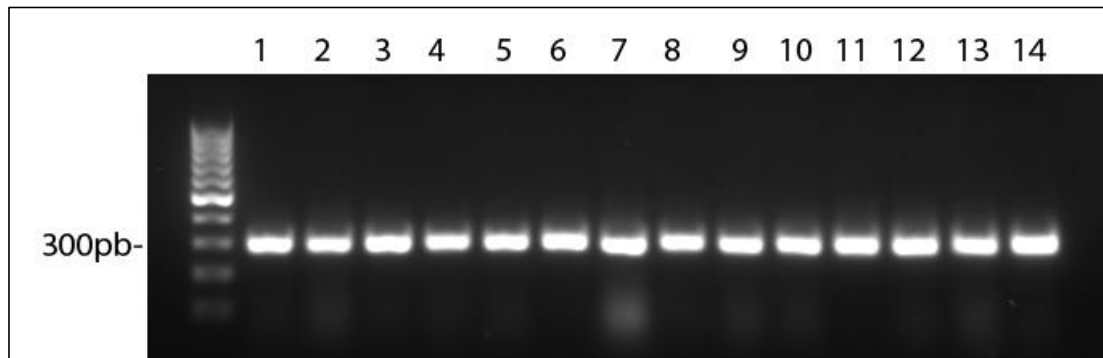


Figura 6. PCR DE COLÔNIA DA CLONAGEM EM pET-32a. Os quatorze clones testados possuíam o inserto ~ 300 pb. PCR feito utilizando-se o oligonucleotídeo iniciador *sense* específico e o *antisense* para o vetor.

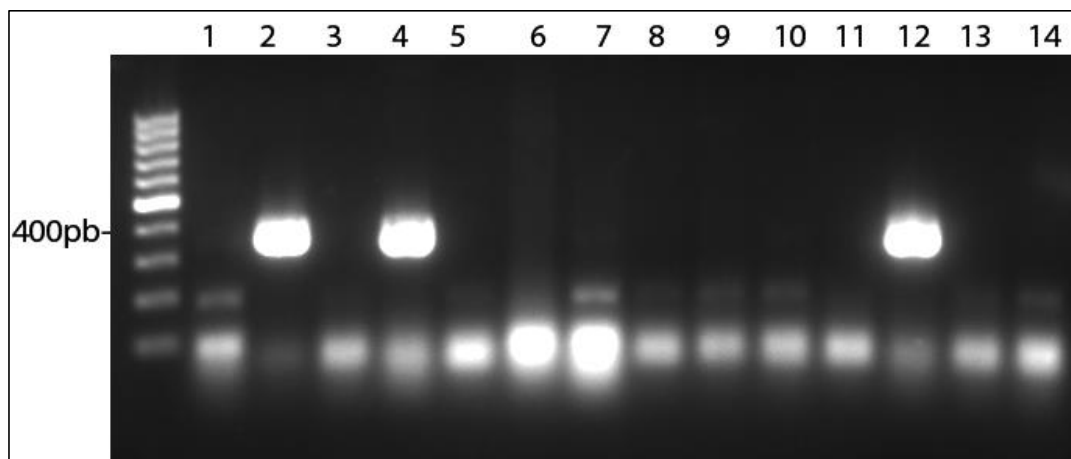


Figura 7. PCR DE COLÔNIA DA CLONAGEM EM pET-SUMO, onde dos quatorze clones testados apenas três possuíam o inserto ligado na orientação correta ~350 pb. O PCR foi feito usando o oligonucleotídeo *sense* específico e o *antisense* para o vetor.

Uma vez que a subclonagem em vetor de expressão foi eficiente, foram escolhidos um clone positivo de cada construção para serem analisados por sequenciamento, para garantir a fidedignidade das sequências quanto a mutações e fase de leitura. O sequenciamento mostrou que as três construções estavam corretas, apresentando 100% de similaridade com a sequência obtida no transcriptoma e na fase de leitura correta.

## 4.2 Expressão das construções para U2-SCRTX-Lit2

Uma vez de posse das construções, essas foram transformadas em cepas de *E. coli* competentes através do método de choque térmico. Para expressão foram utilizadas as cepas AD494, Shuffle T7 Express lysY, Rosetta-gami e BL21(DE3)STAR. Não foram observadas diferenças significativas na qualidade das expressões entre cepas. Por isso, para os resultados mostrados foi utilizada a cepa BL21(DE3)STAR, que é uma cepa de expressão, a qual possui uma deficiência no gene da RNase-E. De tal modo que em tal cepa o mRNA permanece por mais tempo disponível no citoplasma, logo passível de ser traduzido mais vezes, aumentando a quantidade de proteína recombinante sintetizada no final do processo, os resultados são mostrados nas figuras 8, 9 e 10.

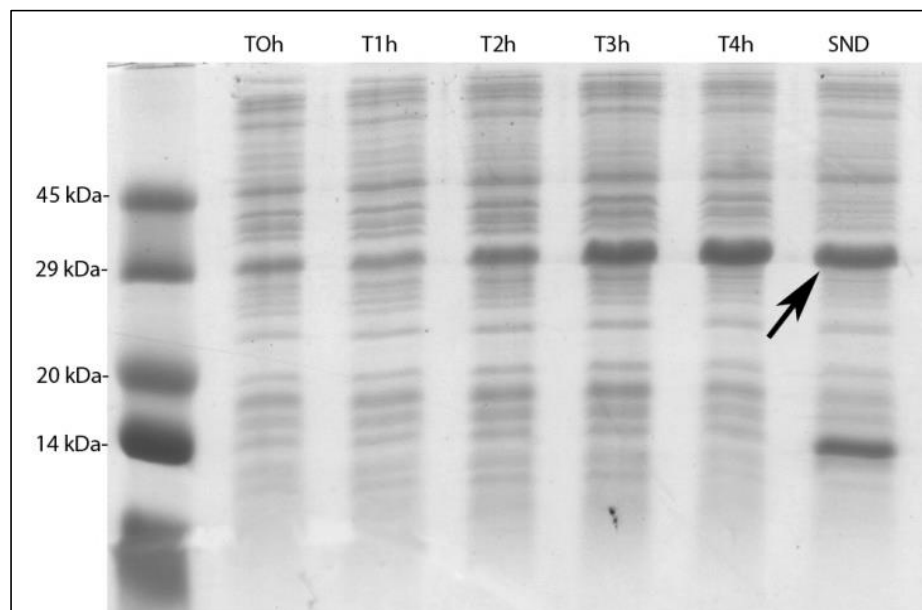


Figura 8 EXPRESSÃO DA U2-SCRTX-Lit2 EM pET-20b UTILIZANDO BL21(DE3)STAR. Expressão realizada a 30° C em meio triptona fosfato, alíquotas retiradas a cada hora. Observa-se uma grande massa expressa de toxina em 4 horas e a maior parte dela se encontra solúvel no indicado pela seta no sobrenadante (SND). A banda intensa na região de 14 kDa é referente a lisozima utilizada no processo de lise das bactérias.

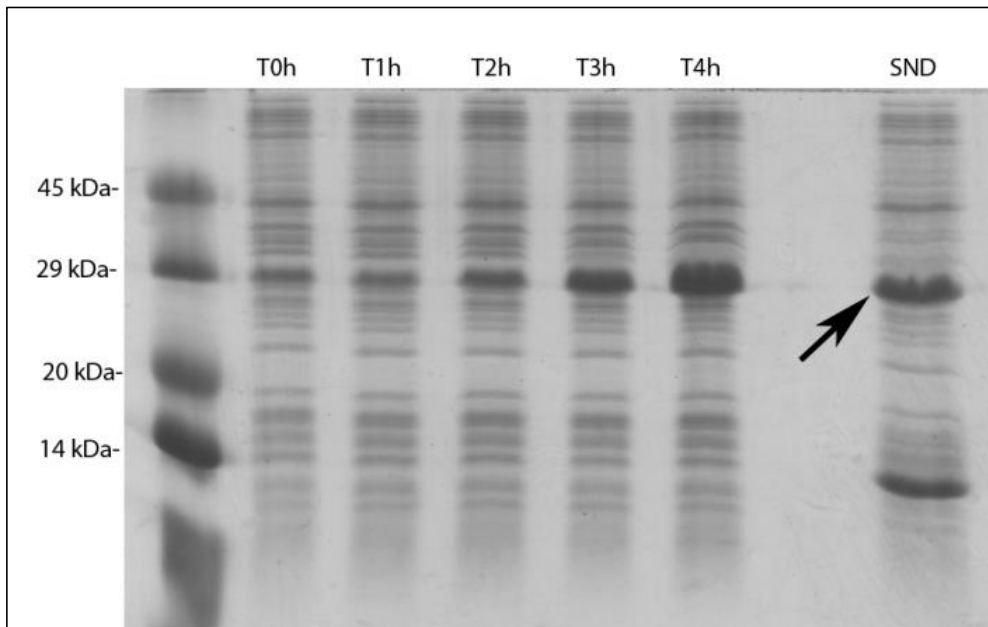


Figura 9 EXPRESSÃO DA U2-SCRTX-Lit2 EM pET-32a Expressão realizada a 30° C em meio triptona fosfato, alíquotas retiradas a cada hora. Observa-se uma grande massa expressa de toxina em 4 horas e a maior parte dela se encontra solúvel no indicado pela seta no sobrenadante (SND). A banda intensa na região de 14 kDa é referente a lisozima utilizada no processo de lise das bactérias.

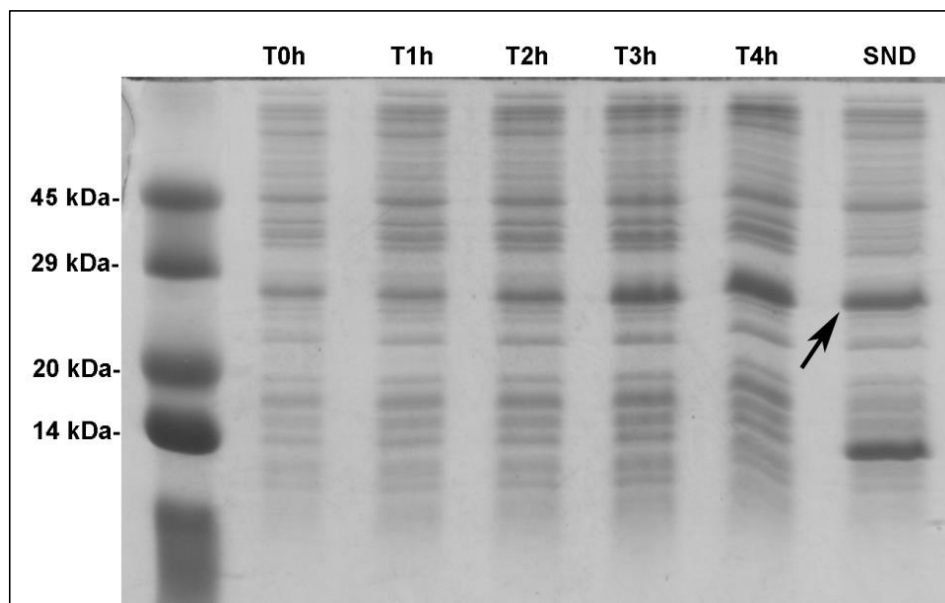


Figura 10 EXPRESSÃO DA U2-SCRTX-Lit2 EM pET-SUMO. Expressão realizada a 30° C em meio triptona fosfato, alíquotas retiradas a cada hora. Observa-se uma massa expressa de toxina em 4 horas que é um pouco menor que a observada para pET-20b e pET-32a. A maior parte da toxina expressa se encontra solúvel indicada pela seta no sobrenadante (SND). A banda intensa na região de 14 kDa é referente a lisozima utilizada no processo de lise das bactérias.

As análises das expressões por SDS-PAGE mostraram que a toxina foi expressa eficientemente com os três vetores utilizados e ainda apresenta-se na fase solúvel. Porém, a massa molecular esperada para a toxina expressa em pET-20b era em torno de 10 kDa e o que foi observado no gel foi uma banda de mobilidade eletroforética de altura aparente em 29 kDa, o que é muito diferente do esperado. Como o gel foi feito em condições desnaturantes e redutoras, descarta-se a ideia de que essa banda seja o produto de agregação da toxina recombinante, devido a essa discrepância, entre a massa esperada e a observada, o trabalho utilizando o pET-20b não foi levado a diante.

Para a expressão em pET-32a, a massa teórica calculada era esperada em ~25 kDa e o observado no gel SDS-PAGE foi uma banda com mobilidade eletroforética de ~28 kDa com uma grande intensidade da banda compatível com a presença da U2-SCRTX-Lit2 solúvel. Para o pET-SUMO, a massa teórica calculada era esperada em ~22 kDa e o observado foi uma banda de ~26 kDa. Devido ao maior rendimento de expressão em pET-32a em relação ao pET-SUMO, constatado após a dosagem proteica, a construção em pET-32a foi escolhida para realizar a expressão em larga escala e, conseqüentemente, a purificação da toxina recombinante. Para isso, foram mantidas as condições testadas na miniexpressão, porém foi utilizado um litro de meio de cultura triptona fosfato. A expressão foi purificada utilizando-se resina Ni-NTA agarose (figura 11). Foram obtidos aproximadamente 10 mg de toxina, na concentração de 0,3 mg/mL, o que foi então utilizado em testes de atividade biológica.



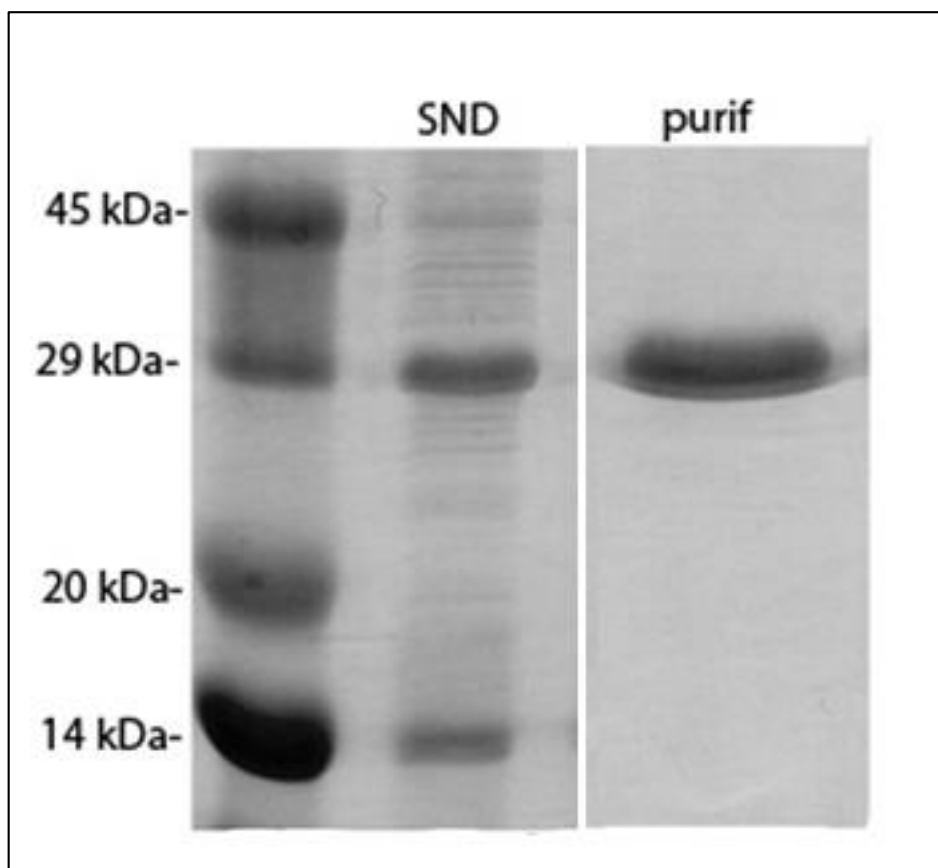


Figura 11. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA U2-SCRTX-Lit2 EM pET-32a. **SND** representa a fração de proteínas solúveis após a lise bacteriana. **Purif** representa a toxina após a purificação em resina de Ni-NTA.

### 4.3 Ensaio de parálise em grilos da U2-SCRTX-Lit2

Para os primeiros testes, foram utilizados como modelos grilos adultos (*Grillus sp.*) adquiridos comercialmente. Os animais foram mantidos em potes separados, grupos controle e tratados, com água e comida *ad libitum*. Os grupos foram definidos com n=3 animais, no grupo controle foi injetado apenas PBS e nos grupos tratados foram injetadas três concentrações diferentes 15 µg, 30 µg e 100 µg. Os animais foram observados por até 72 horas. Não foi observada nenhuma alteração nos animais decorrente da inoculação da toxina, eles não sofreram parálise, ou outro sintoma após a inoculação e nem apresentaram mortalidade no período de observação.

Tendo em vista a falta de atividade biológica da U2-SCRTX-Lit2 expressa em pET-32a, a expressão foi realizada em construção utilizando o plasmídeo pET-SUMO.

As condições de expressão foram as mesmas com pET-32a, a toxina foi purificada com resina de Ni-NTA agarose, porém, a toxina foi submetida a clivagem da proteína de fusão após a diálise. Foi utilizada a protease específica (ULP-1), a qual cliva a proteína SUMO imediatamente antes do primeiro aminoácido da toxina, liberando-a sem adição de nenhuma etiqueta associada. Após a digestão com a ULP-1, o produto da proteólise é novamente submetido à resina Ni-NTA agarose para a retirada do SUMO, da ULP-1 que também possui a etiqueta de histidina e de eventual construção não digerida. Porém a repurificação não foi totalmente eficiente (figura 12).

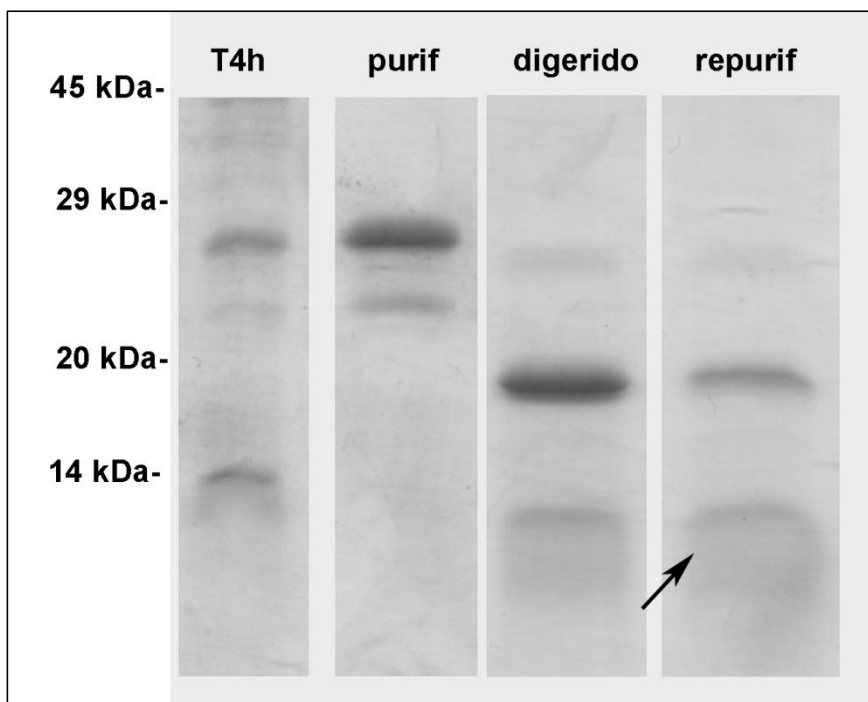


Figura 12 EXPRESSÃO EM pET-SUMO EM LARGA ESCALA DA U2-SCRTX-Lit2. Expressão realizada a 30°C em meio triptona fosfato (**T4h**). Toxina purificada em resina de Ni-NTA agarose e dialisada em PBS apresentando apenas uma banda de contaminante logo abaixo a da toxina (**purif**). Banda mais evidente é referente a SUMO livre ~18 kDa e a banda difusa abaixo é referente a toxina livre (**digerido**). Bandas referentes ao SUMO e a toxina (seta) livres apresentam quase a mesma intensidade após a purificação da digestão com ULP-1 (**repurif**).

#### 4.4 Produção de anticorpos policlonais anti-U2-SCRTX-Lit2 em coelhos

Foram utilizados dois coelhos neozelandeses de aproximadamente 3 kg cada, a toxina injetada foi proveniente da purificação da expressão em pET-32a. A toxina foi injetada em sua forma completa contendo a tioredoxina fusionada a U2-sicaritoxin-

Lit2, foram injetados 50 µg de toxina por coelhos em quatro etapas com intervalos de 21 dias entre elas. Ambos os coelhos responderam bem à imunização, pois os soros obtidos foram capazes de reconhecer a toxina recombinante em ensaios de W.B. mesmo em altas diluições como 1:64000. O soro foi capaz de reconhecer a U2-sicaritoxin-Lit2 expressa em pET-SUMO após a digestão pela ULP-1. Quando testado frente ao veneno o soro reconheceu fracamente peptídeos na região de 5 kDa. Mas acabou reconhecendo as proteínas na região de 30-35 kDa como as fosfolipases e metaloproteases (fig 13). O soro também foi capaz de reconhecer a U2-sicaritoxin-Lit2 expressa em *Pichia pastoris* nas diferentes cepas.

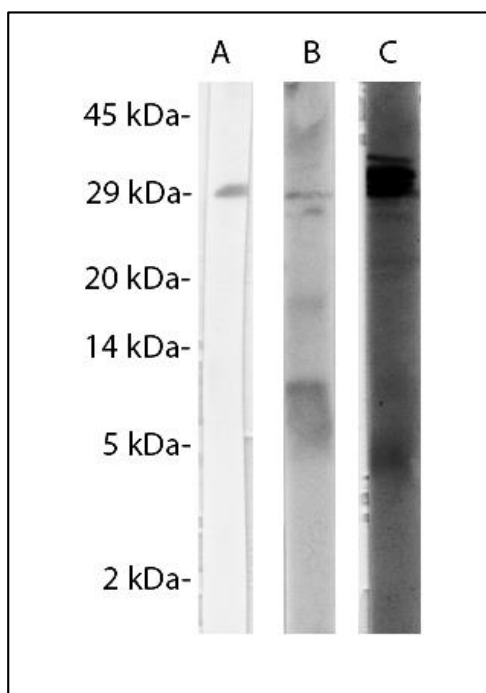


Figura 13. Western blotting utilizando soro hiperimune anti-U2-sicaritoxin-Lit2 produzido em coelhos. A- Soro testado contra U2-sicaritoxin-Lit2 produzida com pET-32a diluído 1:64000. B- Soro testado contra U2-sicaritoxin-Lit2 produzida com pET-SUMO e digerida com ULP-1, banda em ~10 kDa, soro diluído 1:8000. C- Soro testado contra veneno total de *L. intermedia*, onde se observa um grande reconhecimento na região das fosfolipases ~33 kDa e uma marcação mais fraca na região de ~5 kDa, soro diluído 1:500.

#### 4.4 Clonagem da U2-SCRTX-Lit2 em vetor de expressão para *Pichia pastoris*

A sequência anteriormente clonada em vetores de expressão para bactéria foi utilizada como molde para PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para clonagem em vetor pPICZαC contendo os sítios de restrição para *Cla* I e *Xba* I. O produto do PCR foi utilizado para a ligação em vetor de expressão pPICZαC através de digestões e ligação enzimáticas (Fig. 14). A construção foi transformada em cepa de clonagem de *E. coli* Top 10 F' para amplificar o número de cópias do plasmídeo. As colônias bacterianas foram analisadas por PCR quanto à presença do inserto e os

clones positivos foram analisados por sequenciamento quanto a fase de leitura e a ausência de mutações. A partir de um clone positivo foi realizada uma minipreparação de plasmídeos para posterior transformação em células de levedura *P. pastoris*. Para isso foi utilizado o kit “Pichia easycomp transformation kit” seguindo as recomendações do manual. A seleção dos clones transformantes foi feita pela presença de antibiótico zeocina nas placas após a transformação.

A sequência nucleotídica foi otimizada para expressão em *Pichia pastoris* adquirida na empresa GenScript para uma melhor expressão da U2-SCRTX-Lit2, essa sequência foi otimizada e clonada pela empresa a nosso pedido. Uma segunda clonagem foi realizada por nós, onde a sequência otimizada pela empresa foi subclonada no mesmo vetor, porém sem o pró-peptídeo para uma expressão apenas da forma madura da toxina (Fig. 14). Para isso foi utilizado um novo par oligos nucleotídeos iniciadores: para a fita *sense* 5`-GAA TCG ATG GCT TGC GTT GCC TG-3' e para a *antisense* 5`-TA TCT AGA CCG TTA GTA ATA CCC CA-3'. Essa nova clonagem e a otimização da sequência foram analisadas por sequenciamento para conferir a qualidade dessas etapas.

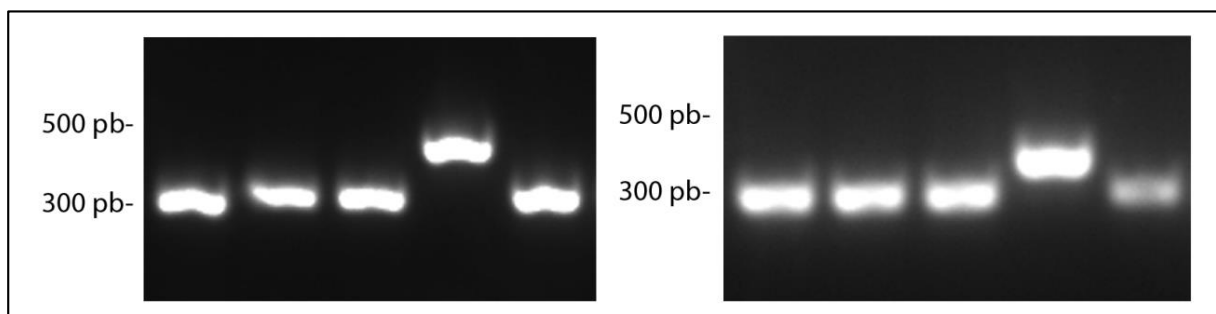


Figura 14. Clonagens da sequência codificante de U2-sicaritoxin-Lit2 em pPICZαC analisada em gel de agarose 1,5%. A esquerda a clonagem da sequência completa contendo o pró-peptídeo, onde foi obtido um clone positivo para a presença do inserto dos 14 clones analisados (~490 pb). A direita clonagem da sequência otimizada e sem o pró-peptídeo, onde foram obtidos dois clones positivos para a presença do inserto (~440 pb) (apenas um é mostrado).

#### 4.5 Expressão de U2-SCRTX-Lit2 em *Pichia pastoris*

Os testes de expressão foram realizados primeiramente em pequena escala em cepa X-33, que é a cepa com genótipo selvagem. Ao final dos quatro dias de expressão as culturas foram centrifugadas e o meio coletado para purificação. Com o intuito de identificar a presença da toxina recombinante no meio de cultura após a indução da expressão por quatro dias, uma amostra de 4 mL foi retirada e concentrada para ~250  $\mu$ L utilizando membrana de filtro seletiva (Amicon® de MWCO 3000). Esse produto da concentração foi analisado em SDS-PAGE corado com azul de coomassie ou utilizado para realização de um *Western blotting* utilizando-se três anticorpos primários diferentes, um anti-6histag, um anti-cMyc e o terceiro anti-U2-SCRTX-Lit2 produzido anteriormente. Essa análise revelou que o anti-6histag não foi capaz de detectar a proteína recombinante (fig. 15 A e D). O anti-cMyc identificou a proteína recombinante, mas esta foi detectada não na forma de uma banda como o esperado e sim na forma de um arrastado (fig. 15 B e E). Esse mesmo arrastado foi detectado pelo anti-U2-sicaritoxin-Lit2 que além desse arrastado reconheceu também proteínas de alta massa, como mostrado na figura 15 C e F.

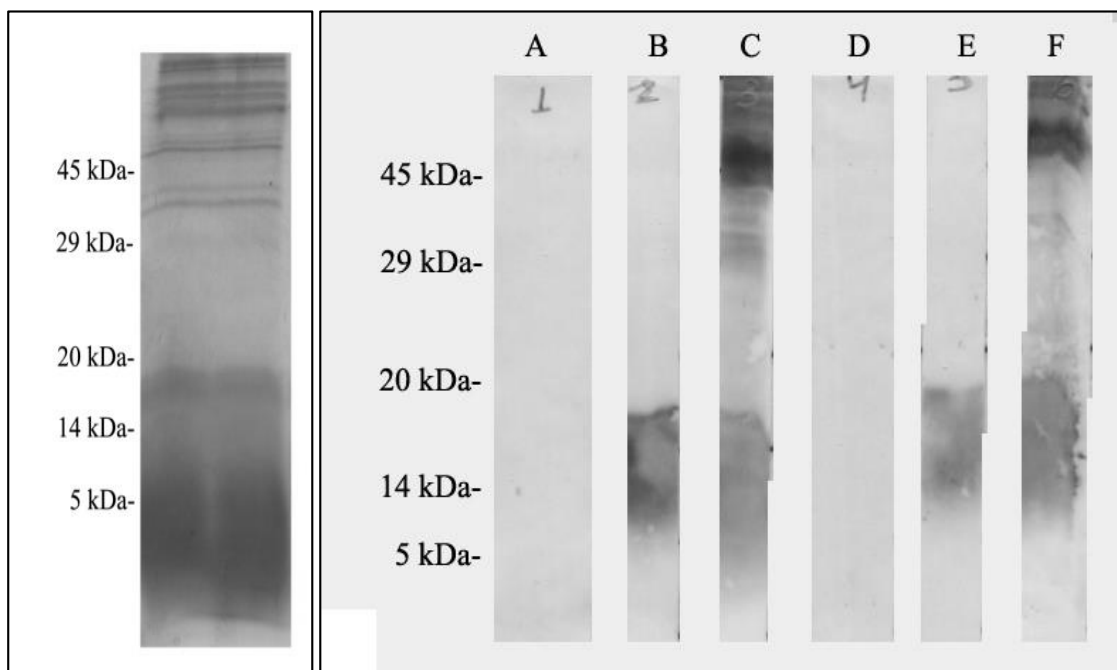


Figura 15. ANÁLISE DO MEIO DE CULTURA APÓS CONCENTRAÇÃO EM MEMBRANA AMICON®. À esquerda mostra o meio concentrado corado com azul brilhante de Coomassie com uma grande quantidade de proteínas abaixo de 14 kDa. À direita W. B. do meio de cultura concentrado com diferentes anticorpos primários. A e D anti-6histag frente à toxina reduzida e não reduzida respectivamente. B e E anti-C-myc frente à toxina reduzida e não reduzida respectivamente. C e F anti-U2-sicaritoxin-Lit2 frente à toxina reduzida e não reduzida respectivamente.

A fim de definir qual clone apresentava a melhor expressão os sobrenadantes das culturas foram precipitados com sulfato de amônio 80% e centrifugados à 9000g por 30 min. O precipitado de proteínas foi ressuscitado em tampão de ligação em resina Ni-NTA agarose e dialisado contra o mesmo tampão para retirar o excesso de sulfato de amônio e realizar a ligação da toxina a resina. Esse processo rendeu aproximadamente 800 µg de toxina recombinante por litro de cultura (fig. 16).

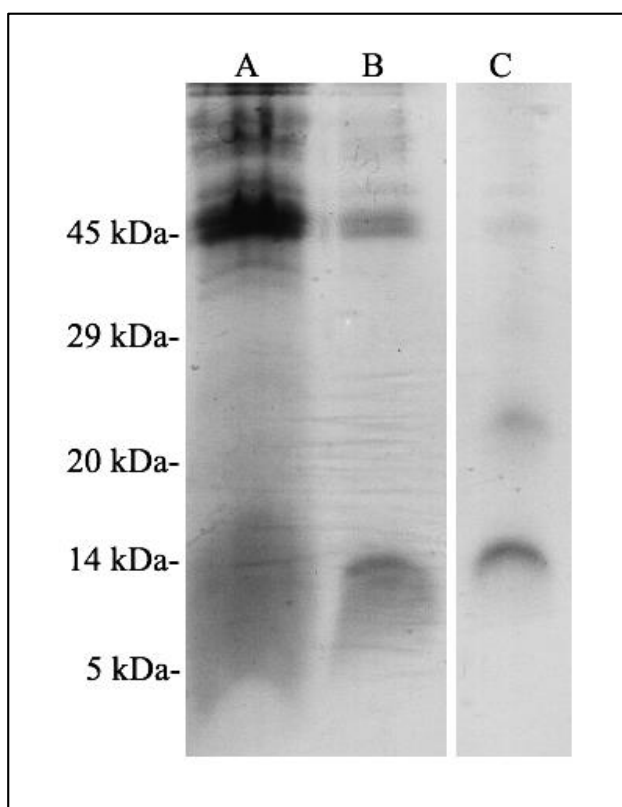


Figura 16. Expressão de U2-sicaritin-Lit2 em *Pichia pastoris* cepa X-33. SDS-PAGE 18% mostrando em: A- meio de cultura após precipitação com sulfato de amônio. B- U2-sicaritin-Lit2 após a purificação em resina Ni-NTA agarose em condições redutoras. C- U2-sicaritin-Lit2 após a purificação em resina Ni-NTA agarose em condições não redutoras.

Após a purificação, o produto foi novamente testado por Western blotting com anticorpos primários anti-6histag e anti-U2-sicaritin-Lit2, em condições redutoras e não redutoras para avaliar a situação da formação das pontes dissulfeto (fig. 17). Pelo W.B. foi observado que o anti-6histag frente a toxina reduzida detectou apenas o monômero (fig. 17A), já quanto a toxina não reduzida foram observadas apenas as formas oligoméricas, dímero, trímero e tetrâmero (fig. 17B). Para o anti-U2-sicaritin-Lit2 frente a toxina reduzida foram detectadas as formas monoméricas e diméricas (fig. 17B). Para a toxina não reduzida o anti-U2-sicaritin-Lit2 detectou o monômero

que não foi detectado pelo anti-6histag e ainda as mesmas formas oligoméricas detectadas pelo anti-6histag (fig. 17D).

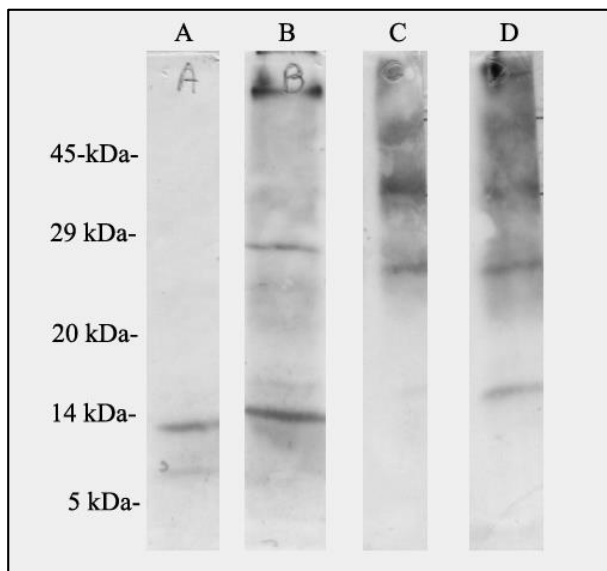


Figura 17. Western blotting da U2-sicaritoxin-Lit2 purificada. Colunas A e C anti-6histag frente à toxina reduzida e não reduzida respectivamente. Colunas B e D anti-U2-sicaritoxin-Lit2 frente à toxina reduzida e não reduzida respectivamente. Ambos anticorpos indicam a presença de formas oligoméricas em condições não redutoras, indicando uma incorreta formação das pontes dissulfeto.

Com o intuito de aumentar o rendimento da expressão da toxina recombinante, foram realizadas outras abordagens a fim de obter maiores quantidades. A primeira tentativa foi realizar a otimização de códons da sequência para expressão em *P. pastoris* que foi adquirida pela empresa GenScript. A sequência otimizada foi transformada em cepa X-33 e foram realizados os mesmos testes e expressão da sequência não otimizada descritos acima. Os novos testes constaram uma mudança muito pequena na melhora do rendimento de U2-SCRTX-Lit2.

Tentando melhorar o rendimento a sequência otimizada foi novamente clonada em pPICZαC agora sem o pró-peptídeo, apenas a forma madura. Essa nova construção foi transformada em cepa KM71H que é Mut<sup>S</sup> obrigatória, o que quer dizer que ela apresenta uma baixa taxa de consumo de metanol, levando a uma produção mais lenta de proteína. Também alteramos a temperatura da cultura durante a indução, a temperatura foi reduzida de 30°C para 15°C, o que é descrito na literatura a auxiliar no dobramento correto de proteínas com pontes dissulfeto. Ainda assim baixas quantidades de U2-sicaritoxin-Lit2 recombinante foram obtidas (fig 18). Então, foi levantada a possibilidade de a toxina expressa estar sendo produzida na sua maioria na forma hiperglicosilada, o que estaria prejudicando a purificação da toxina levando-nos a pensar que a expressão era onde se encontrava o problema. Para tanto, foi realizada uma expressão contendo sorbitol (1%), o que deveria contribuir

para a diminuição da glicosilação da U2-sicaritoxin-Lit2. Nesse teste também foi reduzida a quantidade de metanol (0,25%) para não intoxicar as células durante a expressão, esse teste acabou resultando na ausência de expressão (dado não mostrado).

A figura 19 exemplifica as clonagens da U2-Sicaritoxin-Lit2 realizadas durante os trabalhos no Brasil, onde a U2-SCRTX-Lit2 foi clonada em três diferentes vetores para *E. coli* (pET-32a, pET-SUMO e pET-20b) e em um vetor para levedura (pPICZ $\alpha$ C), contendo e não contendo pró-peptídeo. As construções foram realizadas com o intuito de se obter o melhor rendimento e dobramento da toxina na expressão heteróloga.

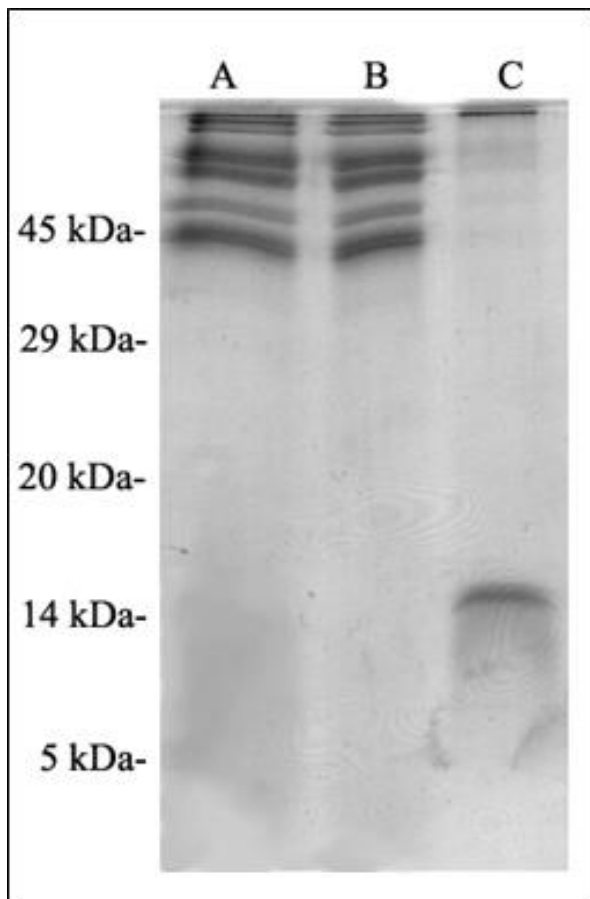


Figura 18. SDS-PAGE 18% da purificação de U2-Sicaritoxin-Lit2 expressa em KM71H. Coluna A- meio de cultura após a precipitação com sulfato de amônio. Coluna B- meio de cultura de A, após ligação em resina de Ni-NTA agarose. Coluna C- U2-sicaritoxin-Lit2 purificada.



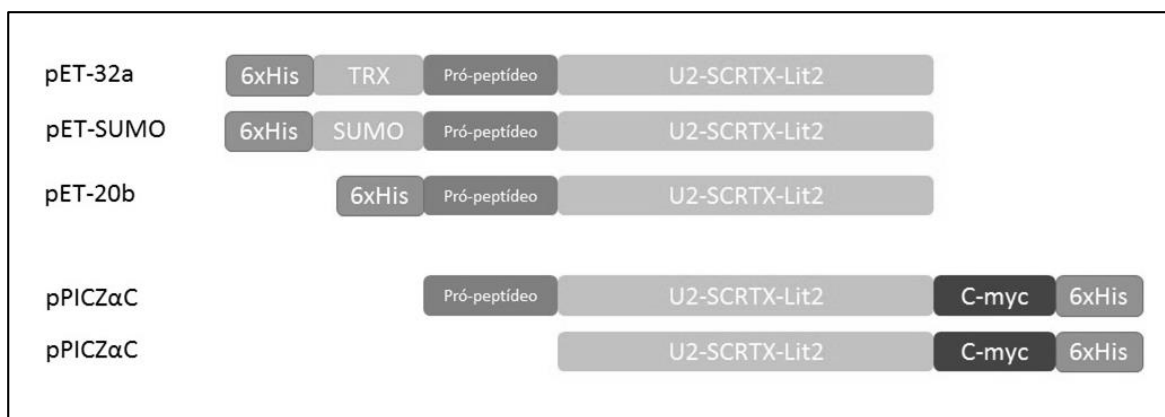


Figura 19. Diferentes construções de U2-sicaritoxin-Lit2 realizadas. Na parte superior as construções contendo o his-tag e pró-peptídeo em todas elas e podendo apresentar uma etiqueta de solubilidade com a proteína SUMO ou a tioredoxina. Na parte inferior as duas construções expressas em levedura contendo his-tag, o epítipo C-myc e contendo ou não o pró-peptídeo.

#### 4.6 Western blotting de colônia e pressão de seleção por antibiótico

A identificação de qual o melhor clone para expressão de proteínas em *P. pastoris* é um processo difícil e trabalhoso. Uma alternativa é a expressão em pequena escala de vários clones para o mesmo peptídeo o que é muito dispendioso em tempo e material. Uma outra abordagem mais funcional e mais simples retratada na literatura é o western blotting de colônia (Krettler *et al.*, 2013). A figura 20 I mostra o resultado esperado para essa técnica, onde as colônias apresentam marcações semelhantes com vermelho de ponceau (fig. 20 I C), e diferentes após a imunomarcacão (fig. 20 I D). A figura 20 II mostra o resultado obtido com essa técnica, em uma comparação com as diversas toxinas que estão sendo trabalhadas em *P. pastoris*. Podemos observar resultados semelhantes ao encontrado no trabalho referência com colônias apresentando uma maior marcação com anticorpos do que com o vermelho de Ponceau. O que observamos foi que o crescimento das colônias sobre a membrana de nitrocelulose é deficiente e isso pode ter causado alguma interferência no resultado. Mas ainda assim consideramos essa técnica eficiente e mais rápida e menos dispendiosa que diversas miniexpressões para achar a melhor colônia pra expressão. Uma outra tentativa de selecionar clones que melhor expressassem a toxina foi transferindo as colônias transformadas para placas de YPD ágar contendo maior concentração de zeocina (500 ug/ml ao invés de 100 ug/ml) e

incubadas 3 dias a 30° C. Como esperado as colônias apresentaram uma diferente taxa de crescimento, teoricamente as colônias que mais cresceram possuem maior resistência ao antibiótico por possuírem várias cópias do cassete de expressão. Isso também poderia aumentar a taxa de expressão por litro de cultura por aumentar o número de RNAm gerado em cada célula.

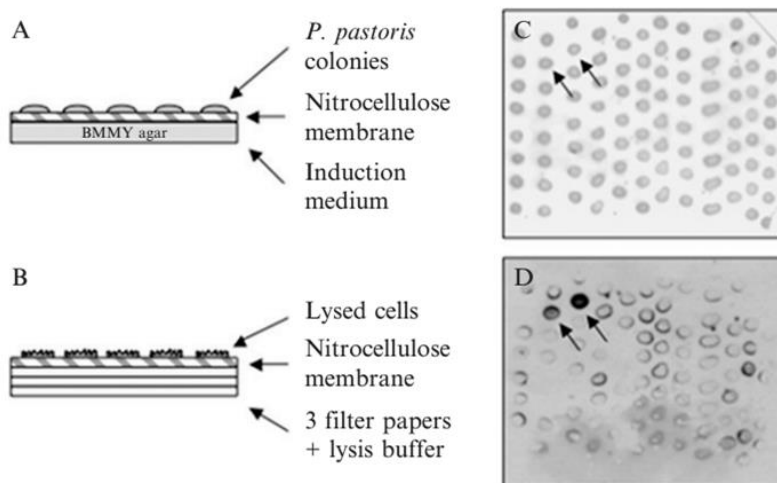


Fig.20 I. Esquema ilustrativo do Western Blotting de colônia. A. Crescimento das colônias sobre membrana de nitrocelulose em meio sólido de expressão. B. colônias lisadas. C. Membrana corada com vermelho de Ponceau onde todas as colônias apresentam a mesma marcação. D. Revelação do W.B. onde as colônias que mais produziram a proteína estão indicadas nas setas.

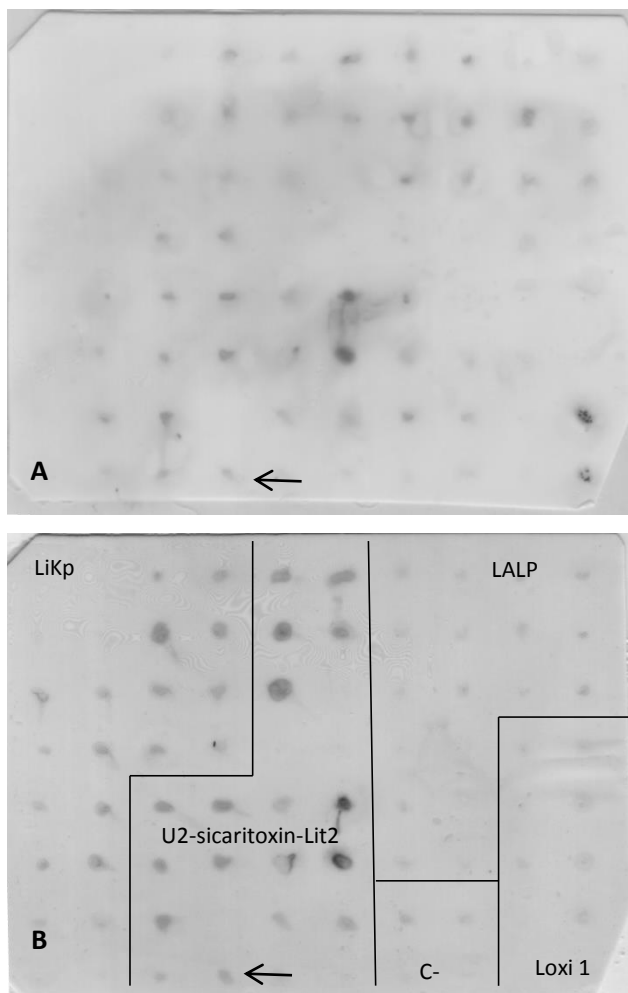


Figura 20 II. Resultado obtido no W.B. de colônia de *P. Pastoris* para várias toxinas diferentes. A- membrana corada com vermelho de Ponceau indicando a presença de proteína. B- W.B. após a revelação mostrando a diferença entre colônias na expressão de toxinas. LiKp- Outra ICK de aranha marrom. U2-sicaritoxin-Lit2- em diferentes cepas. Seta indica o clone de SMD1168H usado na expressão descrita nesse relatório. LALP-Metaloprotease de aranha marrom. Loxi1- Alérgeno de aranha marrom. C- controle negativo, cepa de *P. Pastoris* nativa, sem conter nenhum vetor.

#### 4.7 Expressão e teste de atividade de U2-sicaritoxin-Lit2a em *P. pastoris*

Considerando os resultados obtidos na miniexpressão com *P. pastoris* foi realizada a expressão em larga escala por três dias. Foram usadas uma colônia com grande e outra com baixo crescimento em grande concentração de antibiótico para comparação. Também foi a nova abordagem durante a expressão que é uma expressão com alta densidade de células desde o começo da indução como descrito no materiais e métodos e no teste de expressão. A expressão em *P. pastoris* como descrita no manual deve ser iniciada em uma  $D.O_{600}=1.0$ , porém nessa nova

abordagem a indução começa em D.O.<sub>600</sub>=15.0-20.0 devido ao tempo adicional em meio BMGY. Foi observado que em aproximadamente 3 dias a cultura atinge o platô de crescimento com D.O.<sub>600</sub>= 40.0-45.0. Esse protocolo é uma adaptação do que é feito em culturas em biorreatores onde a cultura atinge densidade ótica muito maior e usualmente a produção de proteína também é maior. Essa nova abordagem combinada com a cepa de menor crescimento em 500 ug antibiótico produziu resultados muito satisfatórios, onde foram obtidas aproximadamente 5 mg de toxina purificada por litro de cultura.

O peptídeo purificado foi injetado em insetos adultos na região ventral entre o Segundo e o terceiro par de pernas para os grilos e baratas. Para as abelhas a injeção foi feita na porção superior dorsal do tórax. Enquanto que para as larvas de mosca foi injetado entre o terceiro e quarto segmento da porção anterior na parte ventral. Essas regiões foram escolhidas pois o sistema nervoso desses animais se encontra mais periférico nessas regiões e pode ser mais facilmente atingido. Após a injeção os animais foram mantidos em observação por até 3 dias para observar a letalidade das injeções. Foram injetados 3 animais por grupo sendo as concentrações 5; 10; 15 e 80 ug/inseto e o controle apenas com PBS. Mesmo após 3 dias não houve mortalidade.

#### **4. Resultados doutorado sanduíche**

Devido às dificuldades técnicas encontradas durante o desenvolvimento dos trabalhos realizados nos primeiros anos de doutorado, resolvemos estabelecer uma parceria com o laboratório de peptídeos de venenos do professor Glenn King da Universidade de Queensland na Austrália. O professor King é um dos maiores nomes na área de ICKs de venenos animais no mundo, com enfoque em aranhas e centopeias. O laboratório conta um grupo composto majoritariamente por doutorandos e pós-docs com grande experiência na área. Logo, eu realizei um ano de estágio-sanduíche no grupo australiano. O objetivo inicial era a realização da expressão recombinante e caracterização de ICKs presentes no veneno de *L. intermedia*. Para tanto foram escolhidas 4 sequências, a U2-SCRTX-LIT2 que era a toxina objeto do projeto de doutorado e também a U2-SCRTX-Lit1b descrita por (Matsubara *et al.*, 2013) e as U1-SCRTX-Lit1a e 2 descritas por (De Castro, C. S. *et al.*, 2004) e (Gremski, L. H. *et al.*, 2010).

#### 4.8 Expressão da toxina U2-SCRTX-LIT2 em bactéria

A expressão da toxina apresentou baixo rendimento, uma vez que o complexo (MBP+U2-SCRTX-LIT2) (Fig. 21) apresenta baixa solubilidade após a expressão, algumas condições de expressão foram testadas para otimizar o processo. A condição escolhida foi em meio LB, com 0,25 mM de IPTG por 16 horas a 16°C, isso permitiu um melhor rendimento da toxina (coluna 4, figura 22). A purificação da toxina em resina de níquel foi satisfatória obtendo-se a toxina com poucos contaminantes. A clivagem da MBP com TEV protease apresentou uma eficiência em torno de 50%, isso porque a construção foi feita de modo a gerar a toxina madura sem nenhum aminoácido extra, assim o sitio de clivagem para TEV contou com uma alanina na posição P1. Pelo fato da alanina não ser o melhor aminoácido para reconhecimento da TEV nessa posição, a eficiência da clivagem foi reduzida (Fig. 22).

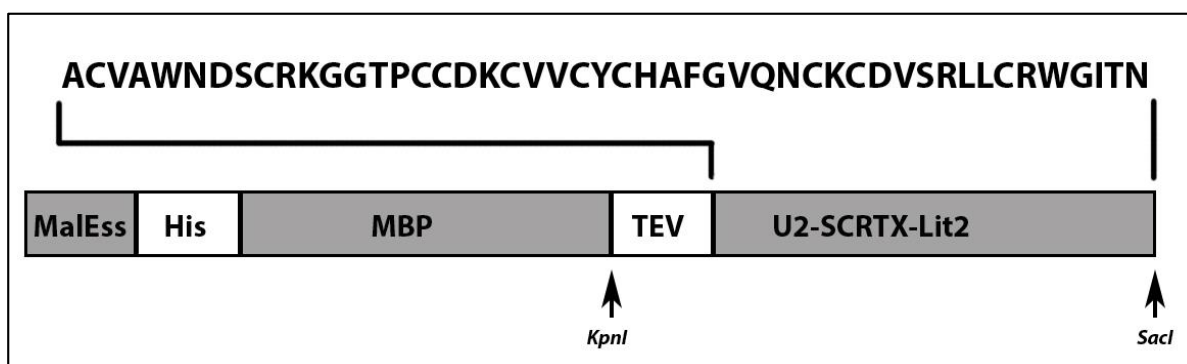


Fig. 21. Componentes da construção para expressão em periplasma fusionado a MBP. MalEss-peptídeo de endereçamento para periplasma. His- 6HisTag usado para purificação em resina de Ni-NTA. MBP- Maltose Binding Protein etiqueta de solubilidade para toxina. TEV- sitio de restrição para TEV. U2-SCRTX-Lit2- sequência madura da toxina com a sequência aminoacídica representada no topo. *KpnI* e *SacI* sítios para enzimas de restrição.

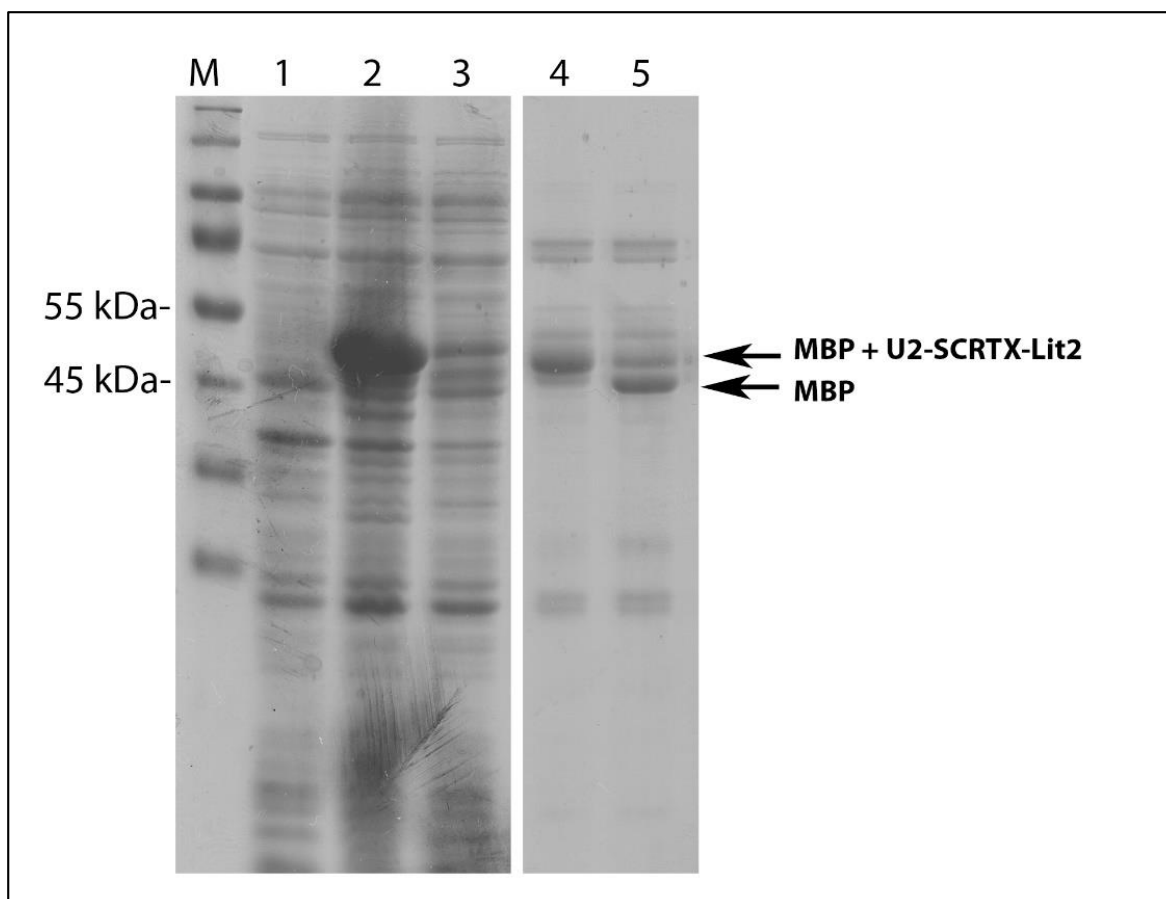


Fig. 22. SDS-PAGE 12,5% da expressão e clivagem da U<sub>2</sub>-SCRTX-Lit2. M- marcador de massa molecular. 1- Cultura antes da indução da expressão com IPTG. 2- cultura após a indução da expressão com a proteína recombinante em grande quantidade (~50 kDa). 3- Fração de proteínas solúveis após a lise das células, a proteína apresenta baixa solubilidade. 4- Proteínas após purificação em resina de Ni-NTA, banda principal é referente a proteína recombinante. 5- proteína recombinante após a clivagem com TEV, eficiência da clivagem em torno de 50-60 %.

Para os próximos passos de purificação em RP-HPLC, a toxina foi corrida em diferentes colunas semipreparativas como C4, C8, C12 e C18 para tentar realizar a purificação. Porém, para todas as colunas e condições testadas, o peptídeo nunca foi obtido, apenas a MBP era obtida no final, fato esse descrito para outros peptídeos, contudo a real razão é desconhecida (Fig. 23).

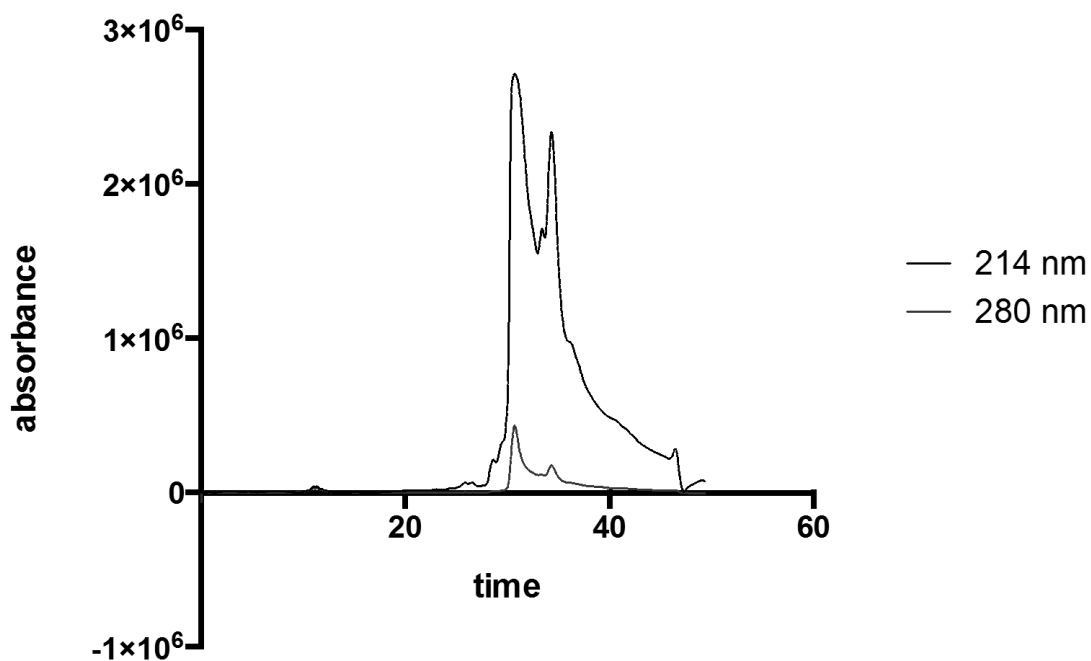


Fig. 23. Purificação da U2-SCRTX-LIT2 em RP-HPLC com coluna C18 semipreparativa. Os picos mostrados na região a partir de 30 min são referentes à MBP, o esperado era que o peptídeo fosse obtido em tempo menor que 30 min. Absorbâncias em unidades arbitrárias medidas em dois comprimentos de onda diferentes, 214 e 280 nm.

Com base nesse resultado, levantou-se a suspeita de que a toxina poderia estar sendo perdida no processo antes da purificação por RP-HPLC. Portanto, foi feita uma nova expressão, purificação e clivagem com TEV. Adicionalmente, após a clivagem com TEV é adicionado TFA como agente pareador de elétrons para purificação em RP-HPLC e, devido ao fato do TFA ser um ácido forte, a toxina poderia estar precipitando. Todas essas amostras foram analisadas em SDS-PAGE 18% (Fig 24).

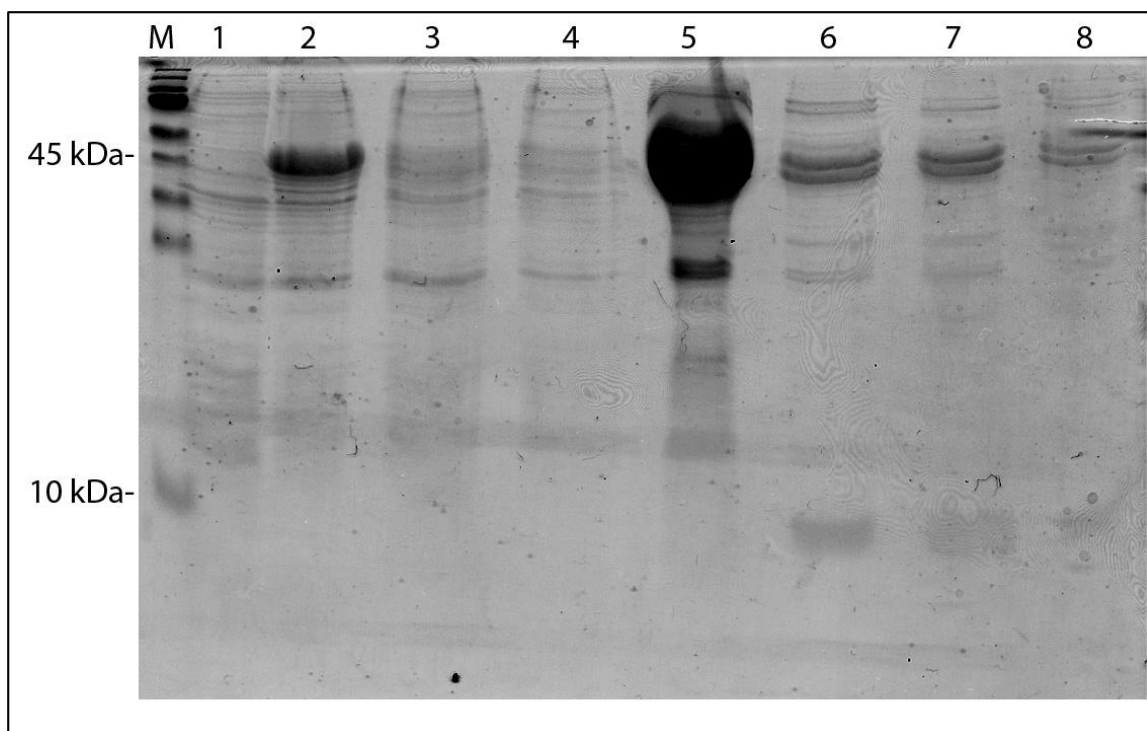


Fig. 24. SDS-PAGE 18% da expressão e avaliação da precipitação da toxina U2-SCRTX-LIT2 antes da purificação em RP-HPLC. M- marcador de massa molecular. 1- cultura pré indução com IPTG. 2- Cultura pós indução. 3- Fração de proteínas solúveis após lise das células. 4- Proteínas que não ligaram na resina de Ni-NTA. 5- proteína recombinante purificada com a resina de Ni-NTA (~50 kDa). 6- Toxina após a clivagem com TEV, eficiência de clivagem ~50% e a presença da toxina em ~7kDa. 7- fração solúvel após adição de TFA, toxina continua presente. 8- fração insolúvel após adição de TFA. Baixa quantidade da toxina presente.

Para confirmar se a banda observada no SDS-PAGE mostrado anteriormente era realmente referente à U2-SCRTX-LIT2, foi realizado o ensaio de espectrometria de massas usando MALDI. Para isso o produto da clivagem com TEV foi preparado para análise. A faixa de massa observada foi de 2-7 kDa região onde se esperava encontrar a toxina. O sinal de massa obtido por MALDI foi de 5275,77 Da e o sinal de massa monoisotópica esperado era de 5275,24; fato que comprova que a banda observada no gel era referente a U2-SCRTX-LIT2 recombinante.



## 4.9 Expressão e purificação da U2-SCRTX-Lit1b em *E. coli*

A metodologia usada para expressão da toxina em *E. coli* usando o vetor pLIC-MBP se mostrou adequada, a toxina foi expressa de maneira solúvel. A utilização da etiqueta de solubilidade MBP associada à expressão em periplasma foram determinantes para o sucesso na obtenção da toxina U2-SCRTX-Lit1b solúvel e ativa. Após a purificação da construção em resina de níquel NTA-agarose a MBP e o 6xHistag foram removidos usando protease TEV, dessa maneira apenas a toxina madura poderia ser obtida após o RP-HPLC. A toxina U2-SCRTX-Lit1b foi obtida majoritariamente em três conformações como observado no cromatograma de purificação usando RP-HPLC com coluna HILIC (fig. 25B). Os dois picos principais apresentam algum tipo de dobramento seguidos por uma fração do peptídeo sem dobramento, o que foi constatado por HSQC (fig. 25). As frações obtidas após o RP-HPLC foram analisadas por espectrometria de massas onde os picos de relação massa/carga obtidos são iguais aos esperados para a U2-SCRTX-Lit1b.

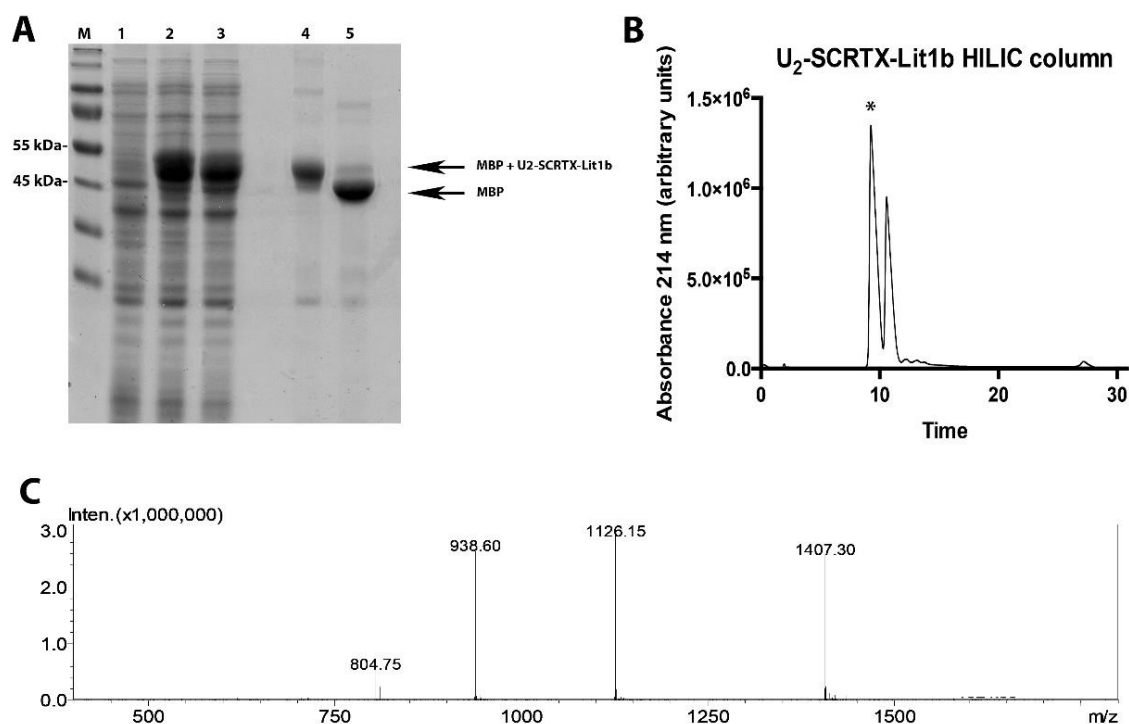


Fig. 25. Expressão, purificação e identificação da U2-SCRTX-Lit1b. A- SDS-PAGE da expressão, mostrando, M- marcador de massa molecular. 1- cultura pré indução da expressão. 2- cultura pós-indução. 3- fração de proteínas solúveis. 4- toxina purificada pós Ni-NTA. 5- Toxina pós-clivagem com TEV. B- Cromatograma da purificação em coluna HILIC, asterisco denota a fração com atividade biológica. C- Sinal obtido no ESI-MS onde o sinal foi correspondente a massas com +4; +5;+6 e +7 m/z, massa monoisotópica predita 5623,32 Da.

#### **4.10 Determinação da estrutura da U2-SCRTX-Lit1b por RMN**

Primeiramente, a análise foi realizada com as três frações da purificação por RP-HPLC em coluna HILIC marcadas apenas com N<sup>15</sup> para determinação da estabilidade da toxina U2-SCRTX-Lit1b para coleta de dados e avaliação do dobramento (Fig. 26 e 27). Isso foi realizado usando a técnica de HSQC com a toxina em tampões com diferentes pHs. Os pHs testados foram 3,45 em tampão citrato, 5,0 em tampão acetato e 6,0 em tampão MES. Para o pH 3,45 houve a presença de alguns picos satélites, algo como ruído no sinal distorcendo a resolução do experimento. Para o pH 6,0 em tampão MES a resolução foi melhor que em tampão citrato porém o sinal foi mais fraco não sendo possível visualizar todos os picos. Já o comportamento em pH 5,0 no tampão acetato foi bom com baixo ruído e boa presença do sinal, devido a composição de aminoácidos da U2-SCRTX-Lit1b eram esperados 60 picos no HSQC e foram observados 62 (Fig. 28).

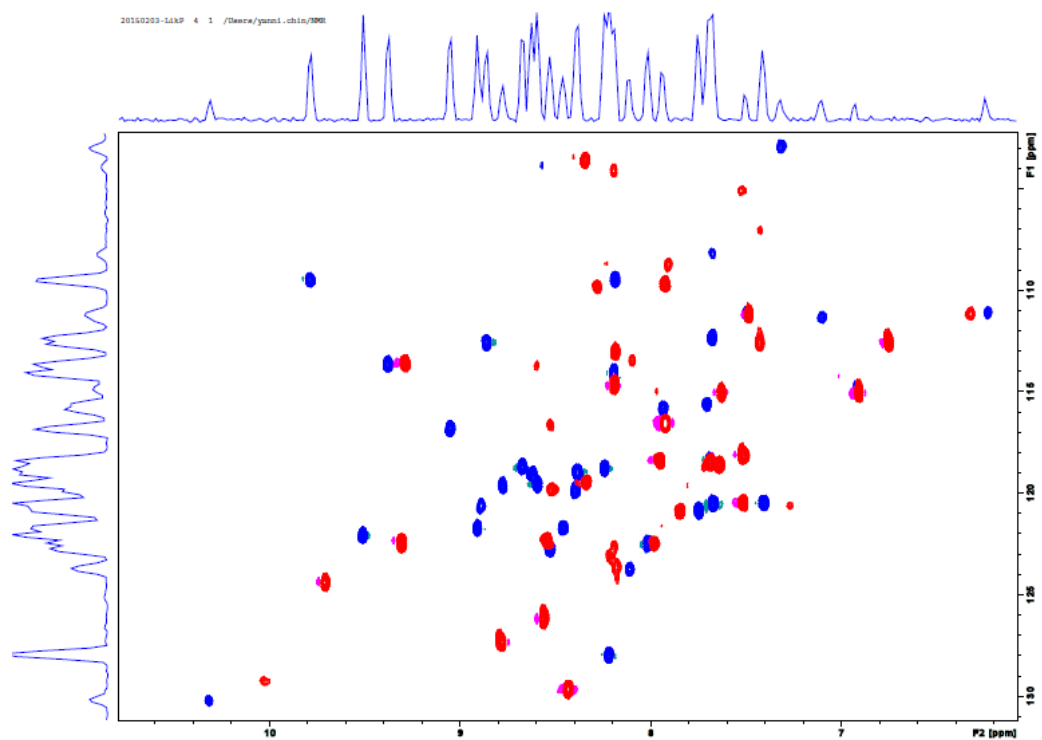


Fig. 26. HSQC dos picos 1 e 2 obtidos após purificação da toxina por RP-HPLC em coluna HILIC. Em azul pico 1 e em vermelho pico 2, a dispersão entre os picos indica que a toxina se apresenta dobrada. Como os picos não se sobrepõem indica que as frações estão em diferentes conformações. Dados coletados com a toxina apenas em água, não em tampão.

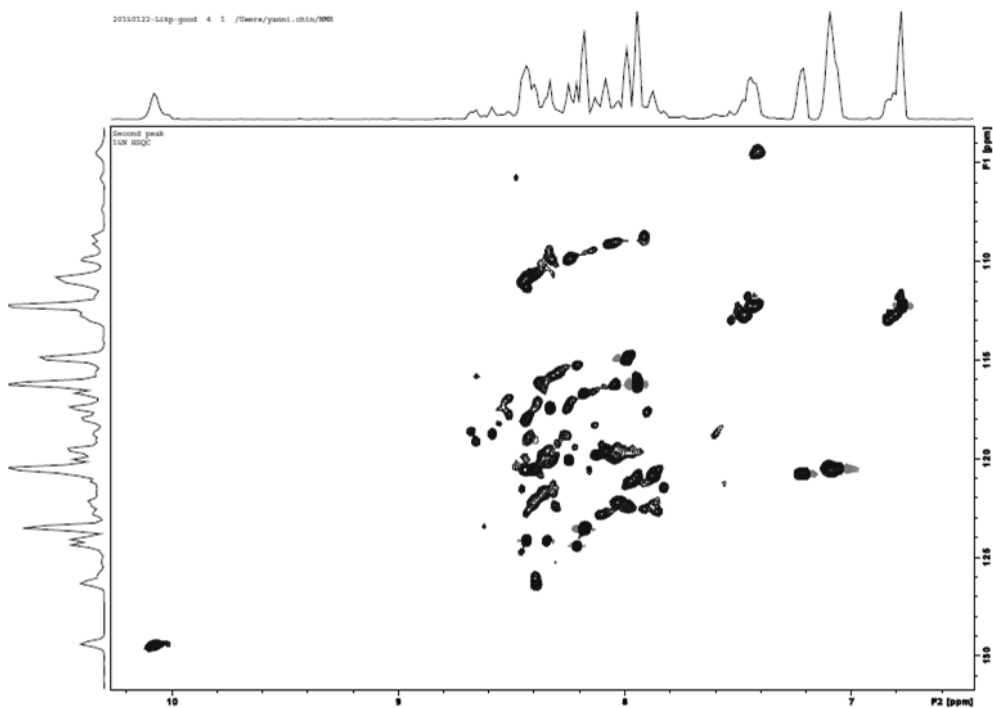


Fig. 27. HSQC do pico 3 obtido após purificação da toxina por RP-HPLC em coluna HILIC, a falta de dispersão entre os picos indica que a toxina não se apresenta dobrada. Dados coletados com a toxina apenas em água, não em tampão.

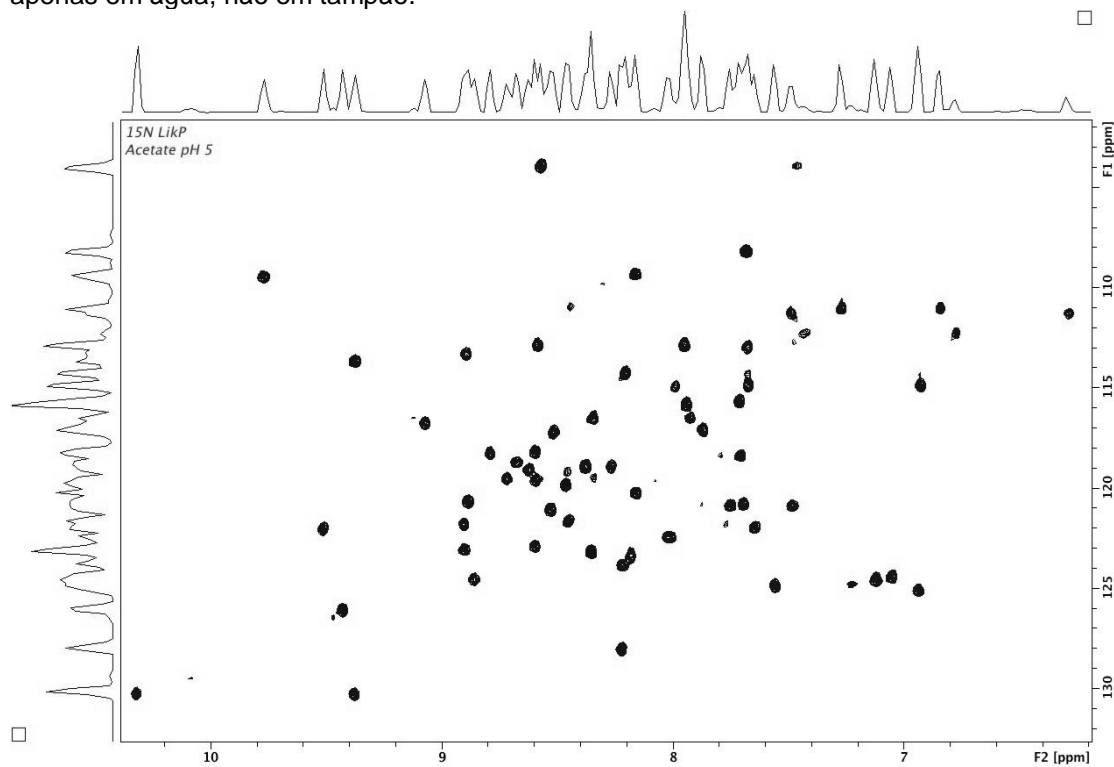


Fig. 28. HSQC do pico da toxina em tampão acetato pH 5,0 onde os picos apresentam uma boa resolução que permitiu a coleta de dados para determinação da estrutura.

Com os bons resultados obtidos no HSQC com a toxina marcada com  $N^{15}$ , o próximo passo foi a produção da toxina marcada com  $C^{13}$  e  $N^{15}$  para determinação da estrutura. Para isso a toxina foi expressa em meio mínimo contendo carbono e nitrogênio marcados e purificada da mesma maneira como descrita anteriormente, os dados foram coletados em RMN 900 MHz (Fig. 29). A coleta de dados e determinação da estrutura tridimensional da toxina foi realizada pela pós-doutoranda Yanni Chin, especialista em RMN que compõem o quadro de especialistas que trabalham no laboratório do Prof Glenn King, Foi possível resolver a primeira estrutura de notina de veneno de aranha com cinco pontes dissulfeto.

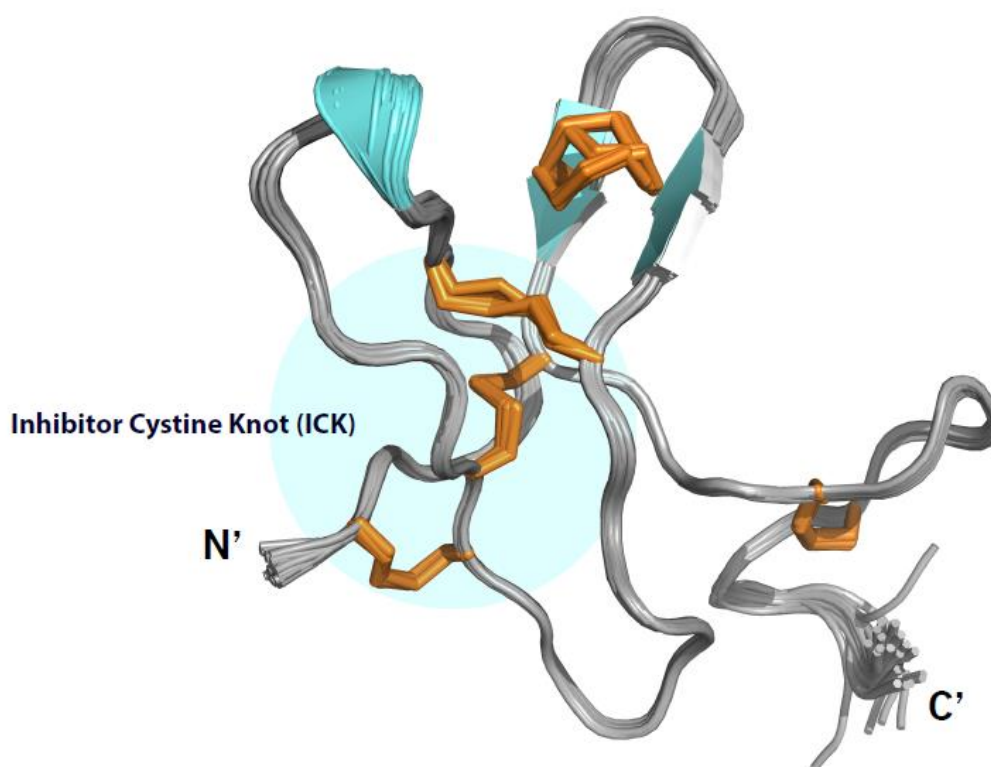


Fig. 29. Estrutura da U2-SCRTX-Lit1b obtida por RMN. U2-SCRTX-Lit1b apresenta cinco pontes dissulfeto, onde as três centrais compõem o motivo Inibidor Nó de Cistina (ICK) destacadas pelo círculo azul. As duas pontes extras estabilizam as outras alças da U2-SCRTX-Lit1b.

#### 4.11 Atividade biológica da U2-SCRTX-Lit1b em moscas

Para os testes de atividade biológica, as frações obtidas na purificação em RP-HPLC foram injetadas em moscas varejeiras de carneiro *L. cuprina* na região ventrolateral. Moscas adultas foram condicionadas individualmente em microtubos de 2 mL foram usadas 10 moscas por concentração de toxina e 20 no grupo controle. Após injeção as moscas foram observadas em intervalos de tempo de 1; 24; 48 e 72 horas, para as maiores concentrações testadas as moscas apresentaram parálise irreversível mesmo depois de 72 horas, havendo óbito por inanição. A análise estatística dos resultados mostrou a que a concentração de parálise PD<sub>50</sub> para o tempo de uma hora foi de  $837 \pm 23$  pmol/g e para o tempo de 24 horas de  $5307 \pm 1967$  pmol/g de mosca (Fig. 30). Isso classifica a U2-SCRTX-Lit1b como uma toxina moderadamente potente em relação a outras toxinas de aranha.

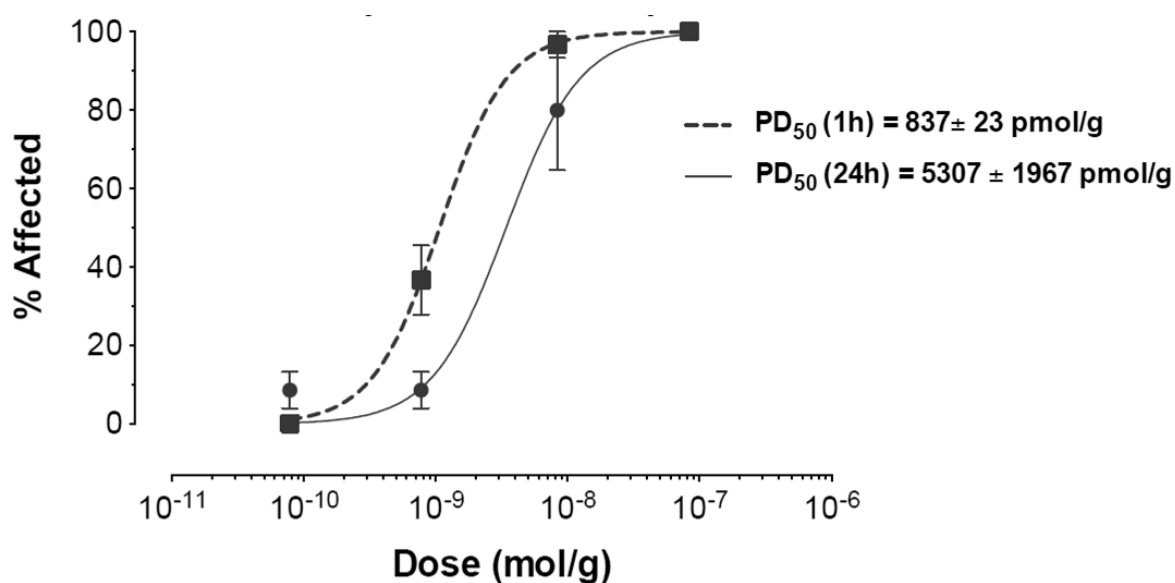
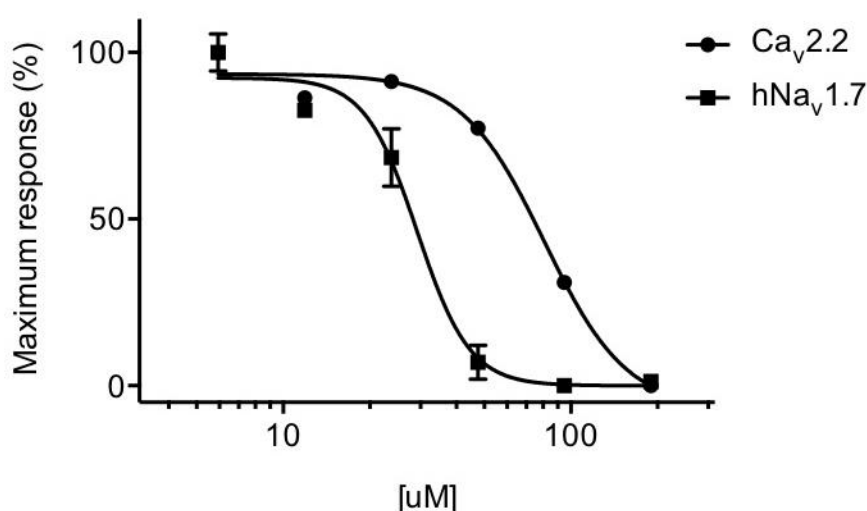


Fig. 30. Atividade da U2-SCRTX-Lit1b em moscas. A toxina foi capaz de causar parálise contrátil em moscas (*L. cuprina*). PD<sub>50</sub> =  $837 \pm 23$  pmol/g para uma hora pós-injeção e  $5307 \pm 1967$  pmol/g para 24 horas pós injeção.

#### 4.12 Atividade da U2-SCRTX-Lit1b em canais iônicos de mamíferos

Como a toxina U2-SCRTX-Lit1b apresentou atividade inseticida, foi também testada a sua atividade em alguns canais iônicos de mamíferos. Para isso foi realizado o ensaio de FLIPR com células SHSY-5Y, onde foi observada uma baixa atividade, devido a  $IC_{50}$  observada ser muito alta; para  $Na_v1.7$   $IC_{50}=29,26 \mu M$  e para  $Ca_v 2.2$   $IC_{50}= 80,86 \mu M$  (Fig. 31). A atividade da toxina foi testada frente a outros canais como TRPA1, TRPV1, TRPV3, TRPV4, e Kv 10.1, porém nenhuma atividade foi observada (dado não mostrado).



	$Ca_v2.2$	$hNa_v1.7$
HillSlope	-3.041	-4.770
$IC_{50}$	80.86	29.26

Fig. 31. Ensaio de FLIPR da atividade da U2-SCRTX-Lit1b sobre canais iônicos humanos de sódio e cálcio. O ensaio mostra a curva de inibição desses canais, a toxina é mais ativa sobre canais de sódio do que de cálcio. Esses resultados mostram uma baixa atividade sobre canais iônicos humanos.

#### 4.13 Expressão e purificação das U1-SCRTX-Lit1a e U1-SCRTX-Lit1b

A expressão das U1-SCRTX-Lit1a e U1-SCRTX-Lit1b se mostrou um pouco menos eficiente que a observada para a U2-SCRTX-Lit1b, desse modo o protocolo de expressão foi adaptado: a expressão foi feita com menor quantidade de IPTG, 0,25 mM ao invés de 0,5 mM e o tempo de expressão passou de 4 para 16 horas com temperatura de 16 °C ao invés de 30°C, com isso as toxinas foram expressas em boa quantidade. A purificação em resina de níquel foi eficiente, a clivagem da MBP foi feita

em tampão da resina, porém em pH 7,0, uma vez que a U1-SCRTX-Lit1b apresenta um pI teórico de 8,05 e a U1-SCRTX-Lit1a de 8,59. Se fosse utilizado tampão com pH 8,0 haveria o risco da toxina precipitar após a clivagem devido à proximidade com o pI. Nesse processo a clivagem apresentou uma eficiência de ~90% devido a presença da serina como primeiro aminoácido da sequência (Fig. 32 e 33).

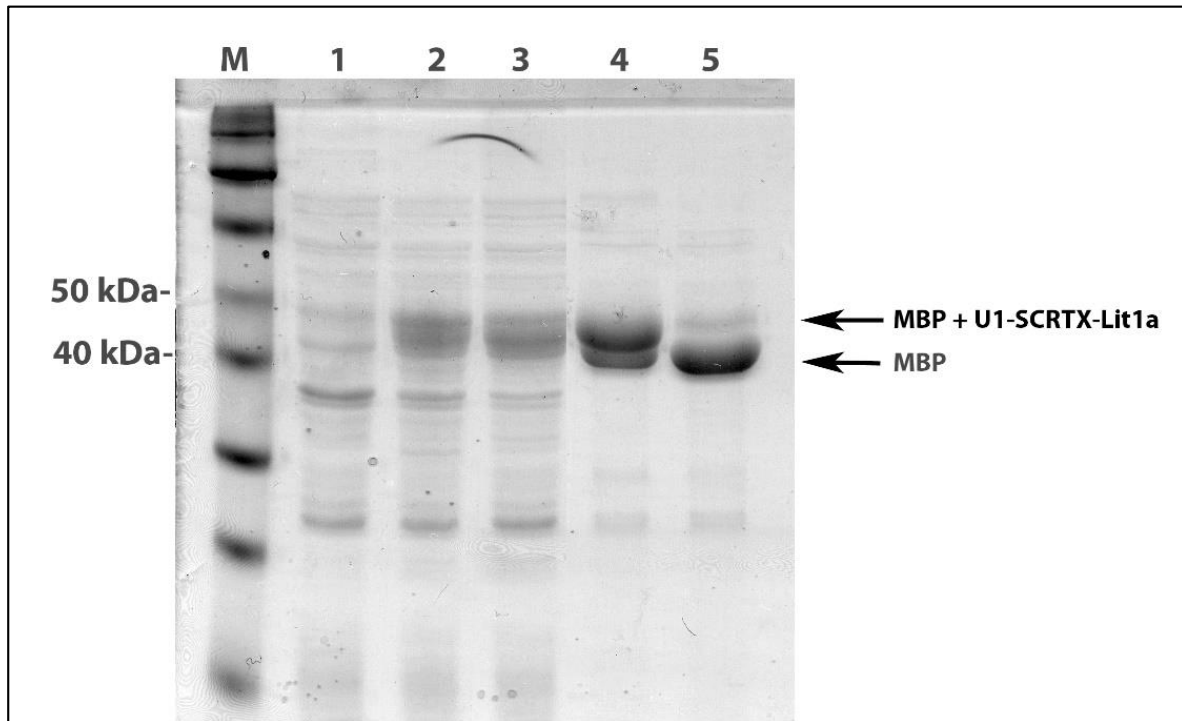


Fig. 32. U1-SCRTX-Lit1a Expressão, purificação e clivagem da toxina. M- marcador de massa molecular. 1- cultura pré-indução com IPTG. 2- Cultura pós-indução com IPTG. 3- fração de proteínas solúveis após a lise das células. 4- Proteínas obtidas após a purificação em resina de Ni-NTA. 5- Proteínas solúveis após a clivagem com TEV, eficiência da clivagem >90%. Setas indicam a proteína completa (MBP+U1-SCRTX-Lit1a, ~47kDa) e apenas MBP ~42kDa.



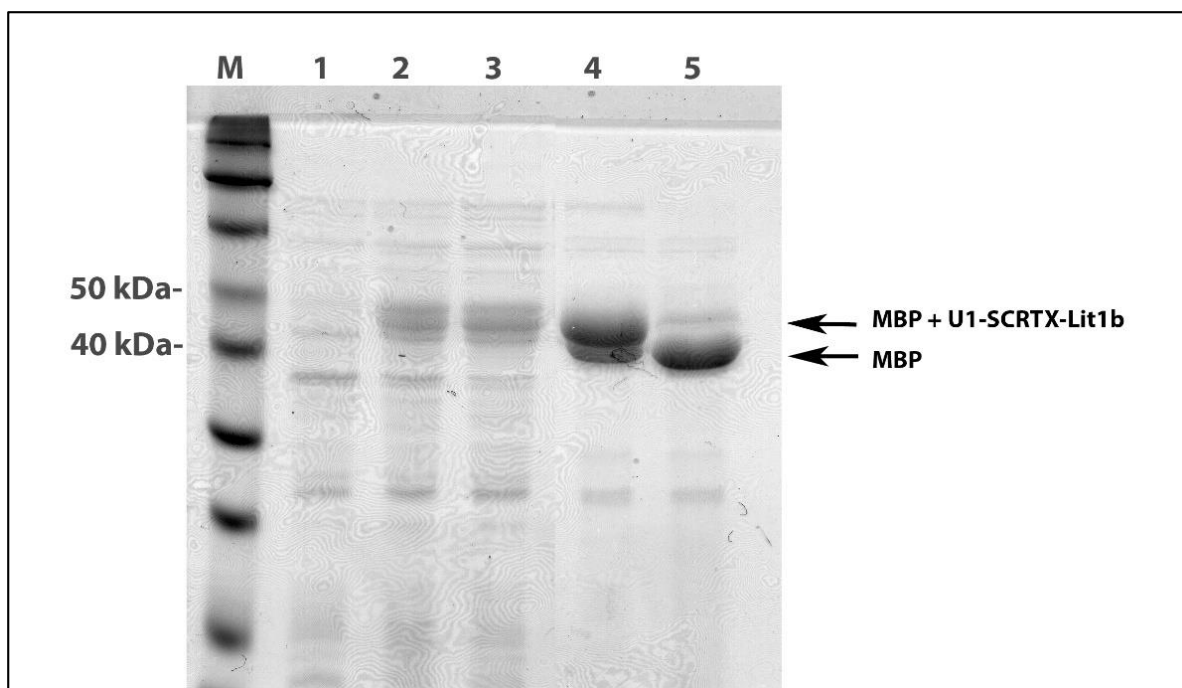


Fig. 33. U1-SCRTX-Lit1b Expressão, purificação e clivagem da toxina. M- marcador de massa molecular. 1- cultura pré indução com IPTG. 2- Cultura pós indução com IPTG. 3- fração de proteínas solúveis após a lise das células. 4- Proteínas obtidas após a purificação em resina de Ni-NTA. 5- Proteínas solúveis após a clivagem com TEV, eficiência da clivagem >90%. Setas indicam a proteína completa (MBP+U1-SCRTX-Lit1b, ~47kDa) e apenas MBP ~42kDa.

Para a purificação das toxinas por RP-HPLC em coluna semipreparativa foi realizada em coluna C4, antes da injeção da amostra no RP-HPLC é adicionado 0,5% de TFA na amostra o que ajuda na purificação da toxina (Fig. 34 e 35). O TFA também precipita o excesso de MBP na solução. O cromatograma obtido para a purificação das duas toxinas foi condizente com o esperado com os peptídeos sendo obtidos antes da MBP. Foi observado também que a U1-SCRTX-Lit1b apresentou uma maior instabilidade quando TFA foi adicionado à solução (dado não mostrado). Isso fez com que fossem adicionados apenas 0,1% de TFA para o primeiro passo de purificação.

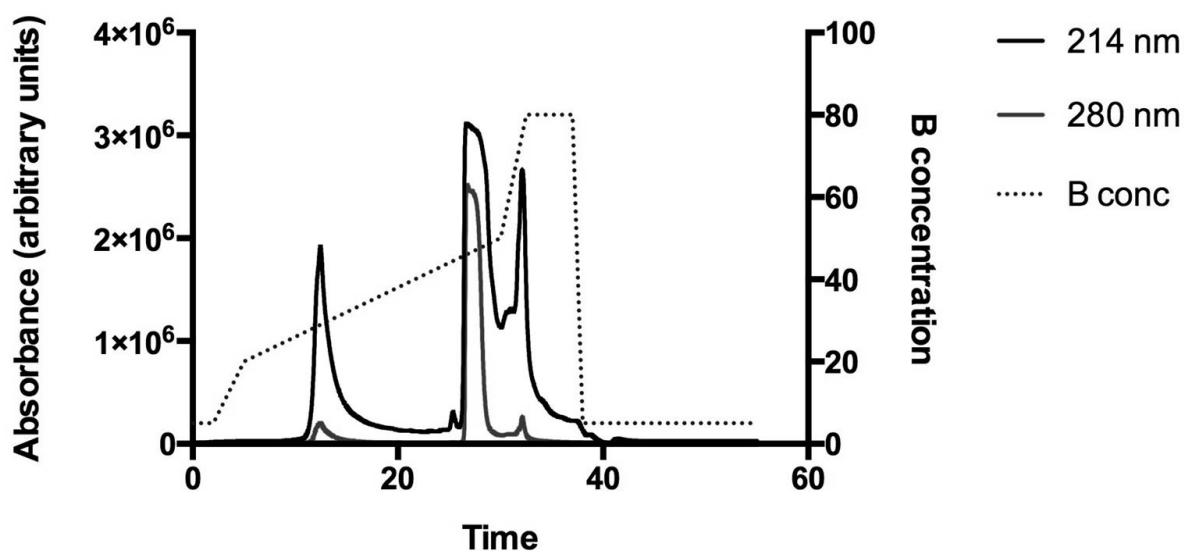


Fig. 34. Cromatograma do RP-HPLC da U1-SCRTX-Lit1a usando coluna semipreparativa C4. Pico em torno de 12 minutos é referente à toxina, pico maior em torno de 25 minutos é referente à MBP. Absorbância medida em dois comprimentos de onda 214 nm e 280 nm. Linha azul representa o gradiente de tampão B.

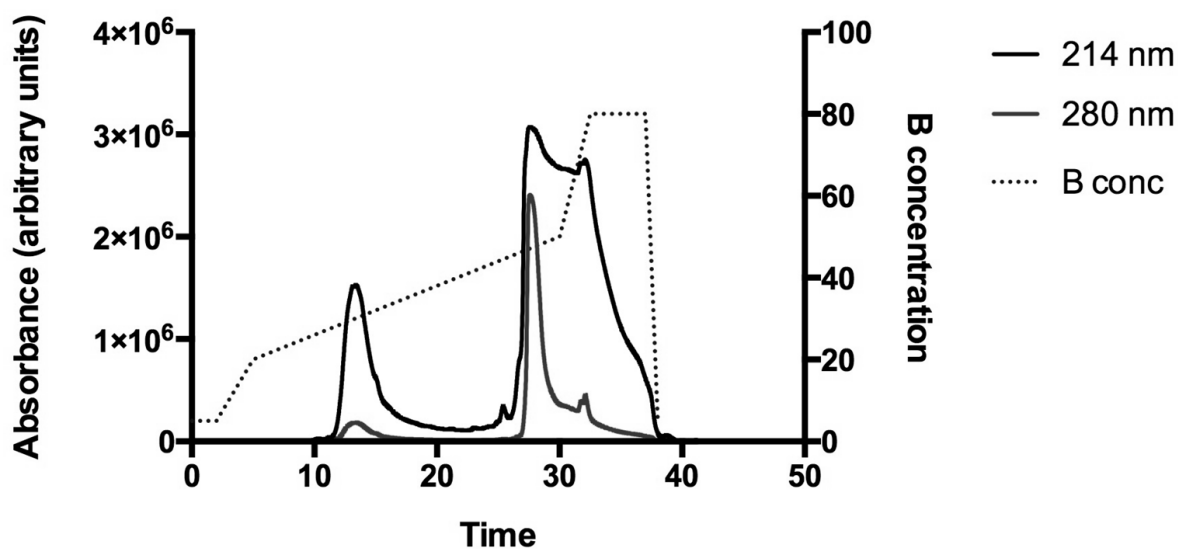


Fig. 35. Cromatograma do RP-HPLC da U1-SCRTX-Lit1b usando coluna semipreparativa C4. Pico em torno de 12 minutos é referente a toxina, pico maior em torno de 25 minutos é referente a MBP. Absorbância medida em dois comprimentos de onda 214 nm e 280 nm. Linha azul representa o gradiente de tampão B.

As identidades dos picos obtidos no RP-HPLC com coluna C4 foram confirmadas usando espectrometria de massas, o que provou que os picos obtidos eram as toxinas de interesse. Essas amostras foram liofilizadas e repurificadas em RP-HPLC usando coluna HILIC que realiza a purificação por diferenças de interações

hidrofílicas com a matriz da coluna. A aplicação dessa coluna permitiu um melhor fracionamento entre as diferentes conformações encontradas em ambas as toxinas (Fig. 36 e 37)

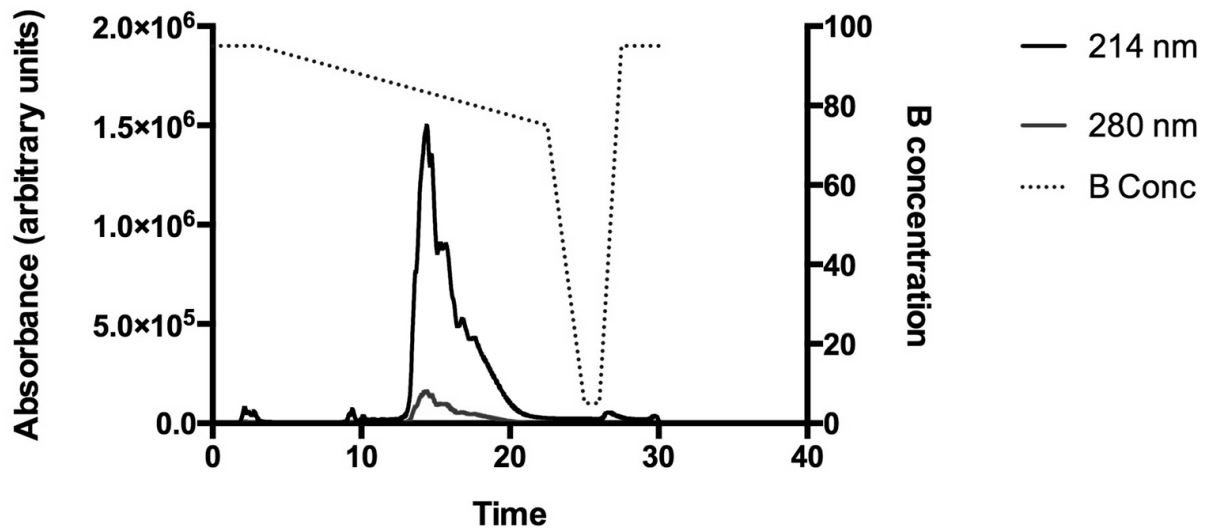


Fig. 36. Cromatograma do RP-HPLC da U1-SCRTX-Lit1a usando a coluna HILIC. Primeiro pico com maior absorvância possui atividade biológica. Picos a direita não possuem atividade biológica. A falta de simetria e a presença de ombros no gráfico denotam a presença de múltiplas conformações da toxina. Absorvância medida em dois comprimentos de onda 214 nm e 280 nm. Linha em azul representa a concentração de tampão B ao longo do tempo.

Para a U1-SCRTX-Lit1b apenas uma purificação em coluna HILIC não foi suficiente, devido ao alto número de conformações ela teve ser injetada duas vezes em coluna HILIC a fim de separar melhor as conformações. Esse processo é representado nas figuras 38 e 39, ainda assim é observado um pico duplo na figura 38 o que indica a presença de mais de uma isoforma nessa fração. Para a segunda fração quando repurificada em coluna HILIC foi observado apenas um pico, indicando a presença de apenas uma conformação (fig. 39).

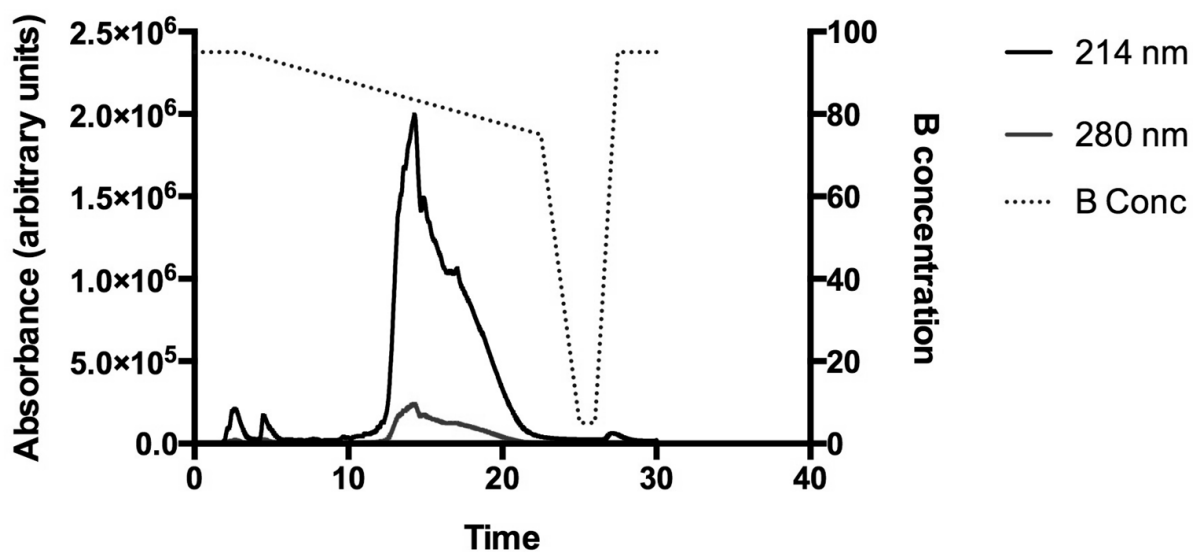


Fig. 37 Cromatograma do RP-HPLC da U1-SCRTX-Lit1a usando a coluna HILIC. Primeiro pico com maior absorvância possui atividade biológica. Picos a direita não possuem atividade biológica. A falta de simetria e a presença de ombros no gráfico denotam a presença de múltiplas conformações da toxina. Absorvância medida em dois comprimentos de onda 214 nm e 280 nm. Linha em azul representa a concentração de tampão B ao longo do tempo.

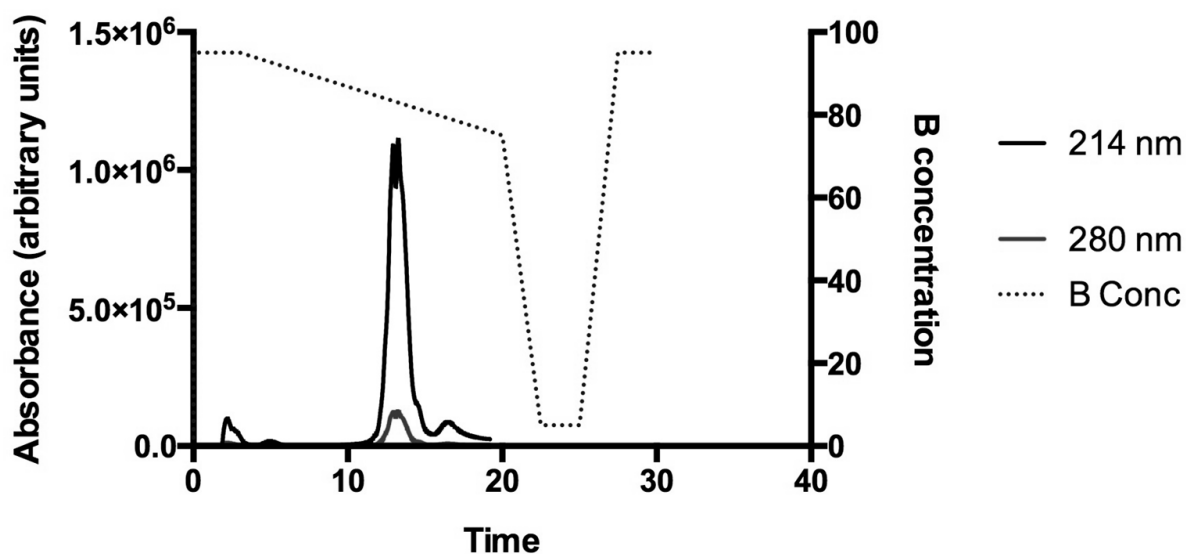


Fig. 38 Cromatograma da repurificação da toxina em RP-HPLC usando a coluna HILIC. A fração analisada ainda possui dois picos praticamente sobrepostos, o que indica duas conformações. Porém melhores resolvidos do que na primeira etapa em coluna HILIC. Essa fração apresentou atividade

biológica. Absorbância medida em dois comprimentos de onda 214 nm e 280 nm. Linha em azul representa a concentração de tampão B ao longo do tempo.

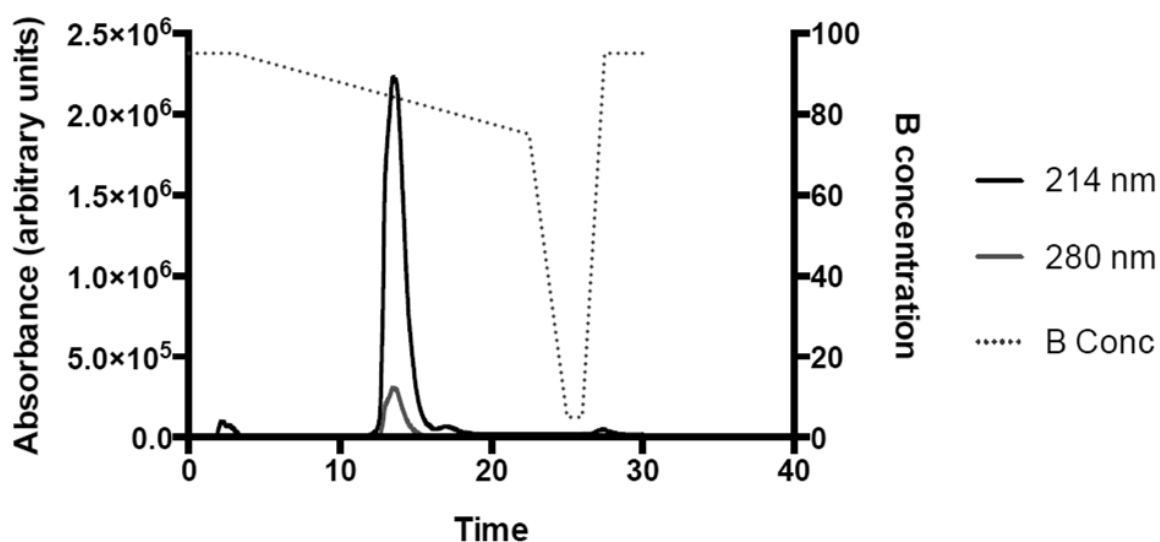


Fig. 39. Cromatograma da repurificação da toxina em RP-HPLC usando a coluna HILIC. A fração analisada possui um pico, o que indica apenas uma conformação. Cromatograma melhor resolvido do que na primeira etapa em coluna HILIC. Fração com baixa atividade biológica. Absorbância medida em dois comprimentos de onda 214 nm (linha preta) e 280 nm (linha vermelha). Linha em azul representa a concentração de tampão B ao longo do tempo.

#### 4.14 Teste de atividade biológica das U1-SCRTX-Lit1a e U1-SCRTX-Lit1b

As frações obtidas após as sucessivas purificações em coluna HILIC tiveram suas atividades biológicas testadas no ensaio de paralise em moscas varejeiras de carneiro (*L. cuprina*). Para isso diluições seriadas foram injetadas nas moscas. Os testes foram feitos em triplicatas com dez moscas por grupo e vinte moscas no grupo controle onde foram injetadas apenas solução salina de insetos. Os resultados em moscas mostraram que a U1-SCRTX-Lit1a é pouco potente com uma  $PD_{50}(1h) = 1411 \pm 41$  pmol/g e com uma letalidade baixa após 24h. Onde a dose letal  $LD_{50}(24h) = 9250 \pm 1499$  pmol/g, classificando-a como toxina de baixa potência inseticida (Fig. 40).

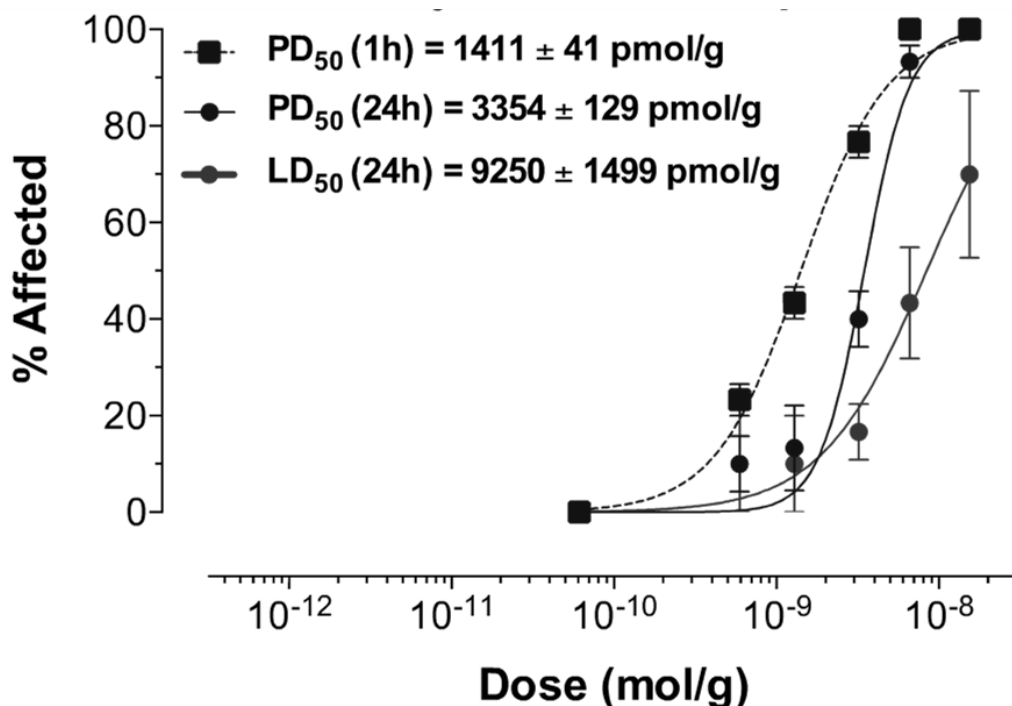


Fig. 40. Teste de atividade biológica da U<sub>1</sub>-SCRTX-Lit1a. Moscas foram injetadas com doses em diluições seriadas e tiveram os afeitos observados em 1 hora e 24 horas após a injeção assim como a letalidade após 24 horas. A análise estatística mostrou uma PD<sub>50</sub> elevada fazendo com que a toxina seja colocada como a menos potente testada nesse trabalho

Para a atividade biológica da U<sub>1</sub>-SCRTX-Lit1b o resultado foi muito mais interessante, pois ela apresentou uma PD<sub>50</sub>(1h)= 471±44 pmol/g e ainda mais potente uma dose letal de LD<sub>50</sub>(24h)= 213±60 pmol/g classificando-a como uma toxina com alta letalidade para insetos (Fig. 41). Essa taxa de letalidade faz da U<sub>1</sub>-SCRTX-Lit1b uma toxina altamente potente entre as toxinas inseticidas testadas. Para os testes sobre canais iônicos humanos, ambas toxinas foram testadas por FLIPR, e apresentaram baixa atividade sobre Ca<sub>v</sub>2.2 com IC<sub>50</sub>= 46,42 e 63,50 μM para U<sub>1</sub>-SCRTX-Lit1a e U<sub>1</sub>-SCRTX-Lit1b respectivamente. Esses valores são menores que os 80,86 μM obtidos para a U<sub>2</sub>-SCRTX-Lit1b testada anteriormente (fig. 31).

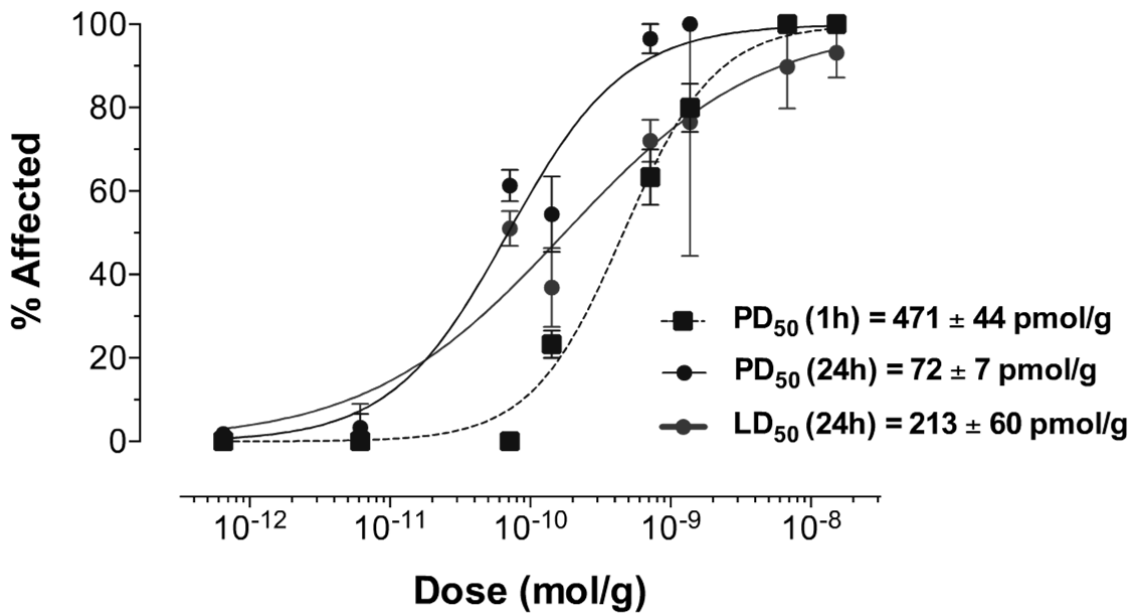


Fig. 41. Teste de atividade biológica da U<sub>1</sub>-SCRTX-Lit1b. Moscas foram injetadas com doses em diluições seriadas e tiveram os afeitos observados em 1 e 24 horas após a injeção assim como a letalidade após 24 horas. A análise estatística mostrou uma PD<sub>50</sub> baixa fazendo com que a toxina seja colocada como a mais potente testada nesse trabalho.

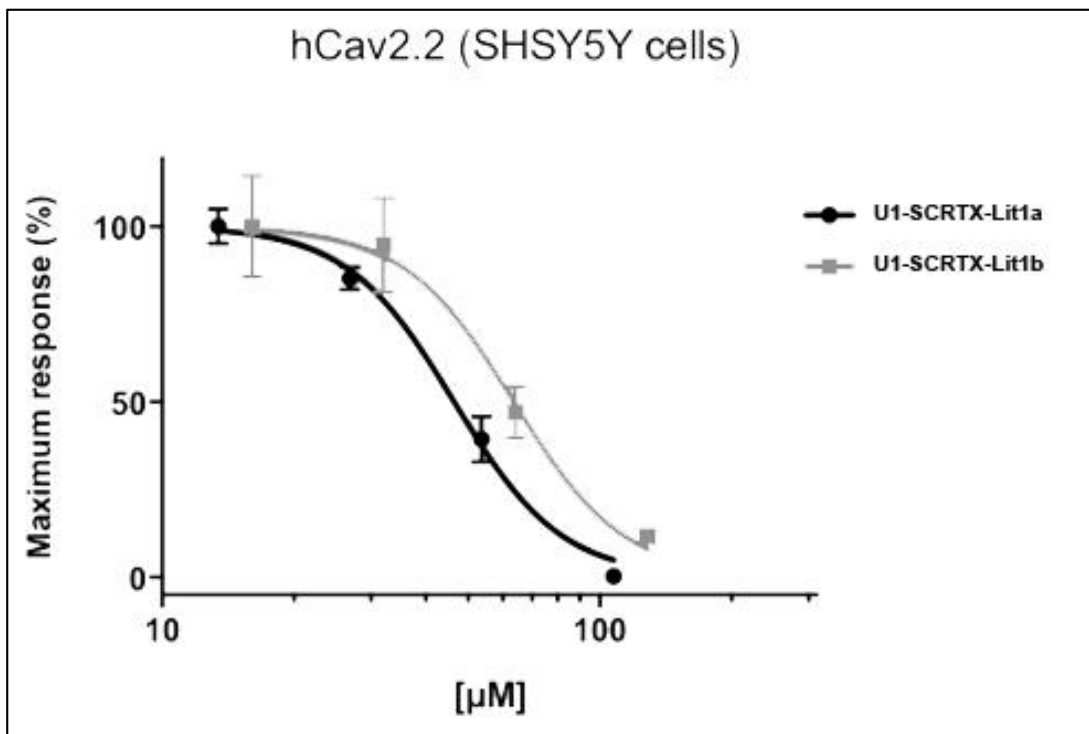


Fig. 42. Atividade da U1-SCRTX-Lit1a e U1-SCRTX-Lit1b sobre canais de cálcio por FLIPR. Atividade sobre canais humanos subtipo Ca<sub>v</sub> 2.2 em células SHSY-5Y, onde as IC<sub>50</sub> obtidas foram 46,42 e 63,50 μM para U1-SCRTX-Lit1a e U1-SCRTX-Lit1b respectivamente. Essas concentrações são menores que as observadas para a U2-SCRTX-Lit1b.

Paralela e adicionalmente, com a possibilidade de desenvolver outras técnicas experimentais durante o estágio de doutorado, realizei a identificação de peptídeos nos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*, que foram fracionados em RP-HPLC analítico e as frações foram analisadas por MALDI-TOF para obtenção do sinal de massas monoisotópicas dos peptídeos constituintes dos venenos. Esses dados estão sendo analisados no momento. Também iniciei uma análise proteômica dos constituintes dos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. Para isso os venenos foram separados em géis de duas dimensões e os “spots” foram processados e analisados em espectrômetro de massas quadrupolo AB 5600. Esses dados estão sendo analisados no presente momento para a determinação dos resultados comparativos.



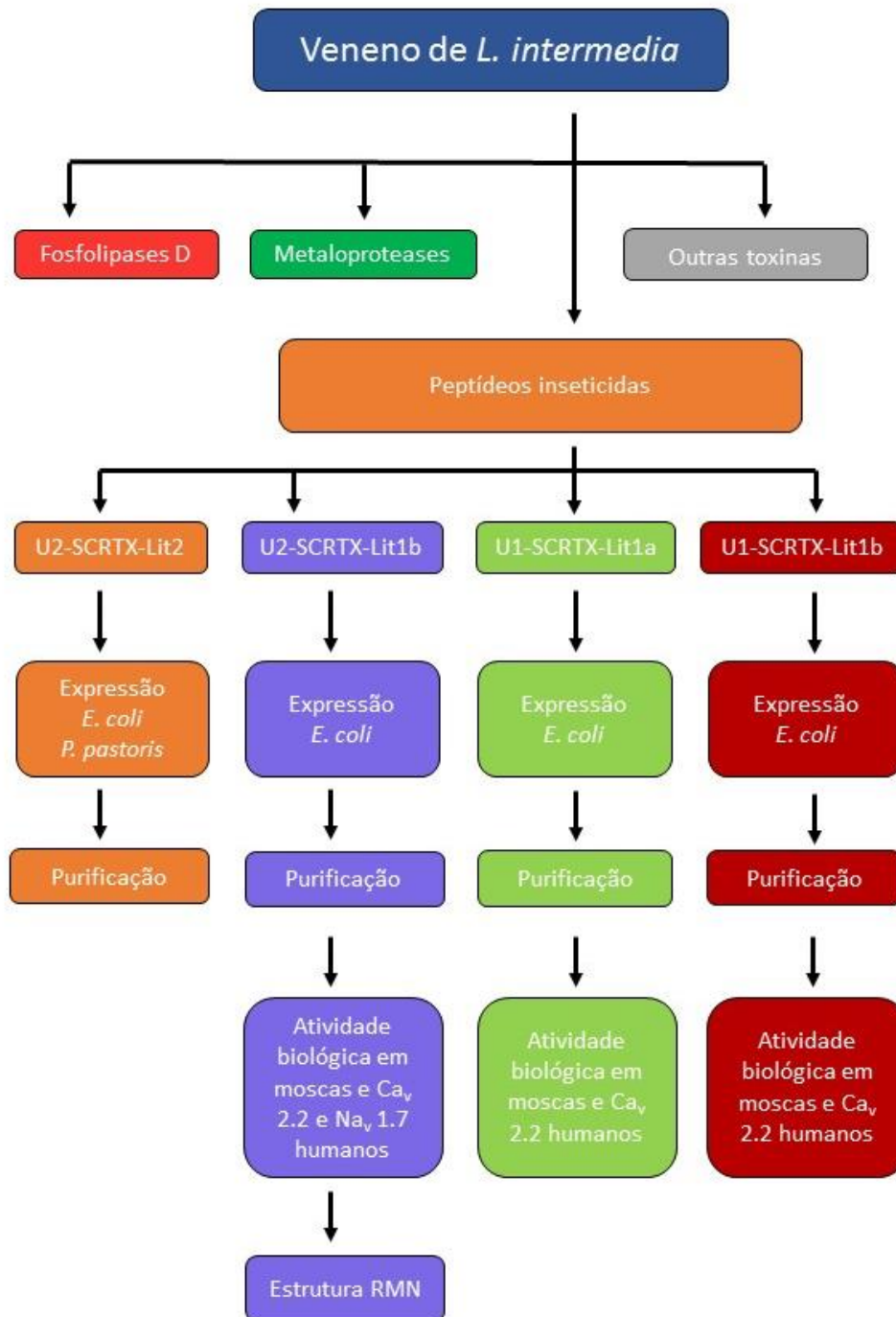


Figura 43. Resumo gráfico dos trabalhos realizados no doutorado. Mostrando a seleção das quatro toxinas, os passos realizados com cada uma.

## 5 Discussão

As aranhas constituem o grupo predador terrestre melhor adaptado e estima-se que existam mais de um milhão de peptídeos nos venenos das mais de 45800 espécies conhecidas (King, 2011; Platnick, 2016). Dentro desse quadro, a aranha-marrom vem sendo muito estudada devido aos efeitos resultantes da sua picada em humanos, a qual é capaz de causar uma lesão dermonecrotica grave, além de distúrbios sistêmicos ou até mesmo morte (Tambourgi *et al.*, 1998; Chaim *et al.*, 2006; Da Silveira *et al.*, 2006). Muito se sabe sobre as fosfolipases e proteases presentes nos venenos de aranhas do gênero *Loxosceles*, mas poucos estudos foram realizados com o objetivo de compreender os peptídeos também presentes nesses venenos. O primeiro trabalho envolvendo peptídeos de aranhas-marrons foi realizado por de Castro e colaboradores (2004), o qual relata a purificação de peptídeos nativos a partir do veneno total de *L. intermedia* e a verificação da atividade inseticida de tais moléculas. Posteriormente, o estudo do transcriptoma da glândula de veneno de *L. laeta* revelou a presença de transcritos relacionados a um peptídeo da aranha *Macrothele gigas* (Fernandes-Pedrosa Mde *et al.*, 2008). O estudo da glândula de veneno de *L. intermedia*, por sua vez, identificou sequências codificantes relacionadas aos peptídeos anteriormente descritos por de Castro e colaboradores (2004), bem como transcritos codificadores de peptídeos similares aos encontrados em *M. gigas* (Fernandes-Pedrosa Mde *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010). O presente trabalho baseou-se na produção recombinante de toxinas da família das notinas presentes no veneno de *L. Intermedia*. De início, o projeto teve como objetivo a determinação da atividade biológica da toxina U2-SCRTX-Lit2. Esse peptídeo representa em torno de 2,4% dos transcritos relativos a toxinas codificados na glândula de veneno de *L. intermedia* (Gremski *et al.*, 2010). Para tanto, foram produzidas diversas formas do peptídeo por meio de clonagens em diferentes vetores para expressão em bactérias (pET-SUMO, pET-32a, pET-20b e pLIC-MBP) e clonagem no vetor (pPICZ $\alpha$  C) para a expressão em diferentes cepas de leveduras.

O vetor pET-32a já foi utilizado para expressão de outras toxinas como a stx2 de *E. coli*. Esta toxina apresenta estrutura dimérica e cada uma de suas subunidades foi expressa de forma separada a partir de clonagens em vetor pET-32a. A toxina stx2 recombinante apresentou atividade biológica semelhante à toxina nativa

comprovando que o vetor em questão pode ser utilizado como uma alternativa para obtenção de toxinas funcionalmente ativas. (Tu *et al.*, 2009). Outros resultados bem sucedidos a partir de clonagens em vetor pET-32a são relatados na literatura a exemplo da protease chitribrina (toxina semelhante à trombina presente no veneno da serpente chinesa *Trimeresurus albolabris*) e de uma da notina rPnTx1 da aranha *P. nigriventer*. (Lin *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012). Em contrapartida, a expressão de uma conotoxina, TxVIA de *Conus textile*, clonada no mesmo vetor resultou em um bom nível de expressão, 10 mg/l, entretanto as pontes dissulfeto associadas com o motivo estrutural ICK não foram formadas e, assim, a atividade biológica não foi observada (Bruce *et al.*, 2011). A expressão de uma notina de anêmona (*Stichodactyla helianthus*) com atividade bloqueadora de canais de potássio do tipo K<sub>v</sub> 1.3 no mesmo sistema de expressão resultou na obtenção da toxina em corpos de inclusão, ou seja, em sua forma insolúvel. Para a verificação da atividade dessa toxina foi necessário a realização de procedimentos de redobramento *in vitro*, o qual proporcionou a obtenção da toxina em sua forma solúvel e ativa (Chang *et al.*, 2012). Resultado semelhante foi obtido na expressão da porção scFv de anticorpo bovino, onde a proteína também se encontrava insolúvel quando expressa a 30°C e apresentou uma ligeira melhora quando coexpressa com chaperonas (Sonoda *et al.*, 2010). Nos nossos testes a U2-SCRTX-Lit2 expressa em pET-32a foi solúvel, porém não apresentou efeito quando injetada em insetos. Sabe-se que diferentes insetos possuem resistências diferentes ao mesmo veneno. Manzoli-Palma e colaboradores (2003) testaram as atividades dos venenos das aranhas *Loxosceles gaucho*, *Phoneutria nigriventer* e *Nephilengys cruentata* sobre abelhas, grilos e broca da cana. Foi observado que para o veneno de *L. gaucho* o modelo mais sensível foram as abelhas com LD<sub>50</sub>= 3,76 ng/mg enquanto para grilos e broca da cana foi de 20,61 e 29,97 ng/mg, respectivamente (Manzoli-Palma *et al.*, 2003). Como realizamos testes em diferentes modelos de insetos poderíamos ter observado atividade da toxina caso ela estivesse ativa. Uma possibilidade associada à ausência de atividade biológica para o peptídeo recombinante em questão seria a própria proteína de fusão, que poderia causar um impedimento estérico e dificultar a interação da toxina com os canais iônicos, uma vez que atividade modulatória de canais é dependente do contato entre alguns resíduos específicos da toxina com outros resíduos-chaves presentes na estrutura destes canais (Motin *et al.*, 2015; Sheets *et al.*, 2015). Outra hipótese que pode estar associada a ausência de atividade é o número de moléculas utilizadas

nos testes de microinjeção em insetos realizados. Pois devemos levar em consideração que a massa molecular da tiorredoxina é considerável em relação ao peptídeo final expresso e a quantidade desta toxina nos ensaios pode ter sido inferior à necessária para a observação da atividade. Como parâmetro de comparação podemos utilizar o ensaio realizado por Corzo e colaboradores (2003), no qual a dose de 10 nM/g de inseto da toxina  $\mu$ -HXTX-Mg2a foi adequada para a determinação da atividade. Tendo como base essa dose e a massa molecular da toxina U2-SCRTX-Lit2 fusionada à tiorredoxina (massa molecular calculada de 25 kDa) seria necessário de 125 a 250  $\mu$ g de toxina por animal, uma vez que os grilos utilizados pesavam cerca de 0,5-1,0 g. Tal quantidade é difícil de ser testada, uma vez que só podemos injetar poucos microlitros nos insetos, resultando em uma limitação do método. Cogitou-se então a alternativa de clivagem da etiqueta de tiorredoxina com a utilização de enzimas como a trombina ou enteroquinase, entretanto como essas enzimas apresentam um alto custo para aquisição, a princípio optou-se por outra estratégia para a obtenção do peptídeo recombinante.

Para as expressões utilizando a toxina clonada em vetor pET-SUMO foram utilizadas as mesmas condições descritas para a construção em pET-32a. A diferença entre a mobilidade eletroforética esperada (~22 kDa) e a observada (~26 kDa) é condizente com trabalhos anteriores que sustentam a ideia de que a proteína SUMO contém alto número de resíduos positivos de lisina, os quais promovem a migração mais lenta das moléculas e resultam na diminuição da mobilidade eletroforética em torno de ~4 kDa (Satakarni e Curtis, 2011; Souza *et al.*, 2012b). A proteína SUMO vem sendo utilizada amplamente como proteína de fusão por aumentar a solubilidade de diferentes proteínas recombinantes como interferon gama humano, peptídeos antimicrobianos, antioxidantes e anti-hipertensivos (Li, 2013; Rao *et al.*, 2016; Tileva *et al.*, 2016). Dessa forma podemos considerar o uso de proteínas de fusão com o intuito de melhorar a solubilidade de proteínas recombinantes e obter melhores resultados. A proteína SUMO por exemplo já foi colocada *in tandem* com outras proteínas como a glutationa S-transferase (GSH), a proteína ligante de maltose (MBP), a tiorredoxina (TRX) entre outras, melhorando assim a solubilidade de proteínas pouco solúveis (Guerrero *et al.*, 2015). Para a nossa construção a clivagem da etiqueta SUMO foi feita com a enzima ULP-1, realizada em tampão PBS, o qual não é o mais indicado para a atividade ótima da enzima, mas que mesmo assim

revelou ser eficiente, como mostrado na figura 11. Após esse processo de digestão da construção obtivemos ~3 mg de toxina livre, uma vez que a toxina representa apenas um terço da molécula completa (proteína SUMO possui 14 kDa e a toxina em estudo ~7 kDa). Quando o produto da digestão foi analisado em gel SDS-PAGE sob condições não-redutoras, na qual as pontes dissulfetos não são desfeitas, a banda referente ao SUMO livre se apresentava inalterada. Porém a banda referente à toxina livre, que em condições redutoras se apresenta na altura de ~7 kDa, demonstrava agregação do peptídeo, observada pela formação de um complexo de alta massa molecular que não foi capaz de ser separada em SDS-PAGE 18%. Devido a essa observação a atividade biológica da U2-SCRTX-Lit2 após a clivagem não foi testada em insetos, uma vez que a toxina deveria passar por um processo de redobramento *in vitro* para chegar a sua estrutura monomérica e corretamente dobrada. O pET-SUMO já foi utilizado na expressão de um peptídeo da família das notinas de aranha armadeira *P. nequiventer*, a qual resultou na obtenção do peptídeo na fração solúvel de proteínas; tal peptídeo apresentou atividade biológica semelhante a toxina nativa (Souza *et al.*, 2012b). Nesse mesmo trabalho uma parte da toxina se encontrava na forma de corpos de inclusão e para obter atividade biológica foram utilizadas técnicas de redobramento utilizando uma série de compostos redutores e oxidantes como DTT, GSH, GSSG e L-arginina. Esses compostos são utilizados para uma série de outros redobramentos *in vitro* de notinas, resultando em toxinas estruturadas e biologicamente ativas (Price-Carter *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). Porém os protocolos de redobramento *in vitro* testados com o objetivo de produzir o peptídeo U2-SCRTX-Lit2 recombinante corretamente dobrado não foram eficientes.

A U2-sicaritoxin-Lit2 expressa usando o pET-32a foi utilizada na produção de soro policlonal em coelhos. O soro anti-U2-sicaritoxin-Lit2 produzido em coelhos foi capaz de reconhecer a toxina recombinante quando expressa por bactérias em diferentes vetores como pET-32a e pET-SUMO. Também foi capaz de reconhecer as formas recombinantes produzidas em *P. pastoris*, mas não foi conclusiva a capacidade de reconhecer a forma nativa da toxina quando testado frente ao veneno. O não reconhecimento da toxina nativa pode estar relacionado ao fato da toxina nativa estar em baixa quantidade no veneno total, uma vez que pelo transcriptoma da glândula de veneno de *L. intermedia* os transcritos para U2-sicaritoxin-Lit2 representam apenas 2,4% dos transcritos de veneno (Gremski *et al.*, 2010). Quanto

ao fato do anticorpo reconhecer as fosfolipases do veneno, o mais provável que seja devido a uma reação cruzada entre os anticorpos produzidos e as fosfolipases. A reação cruzada pode ter sido ocasionada devido ao anticorpo ter sido produzido utilizando a construção total, isto é a U2-sicaritoxin-Lit2 fusionada a tioredoxina, S-tag e o his-tag que são as proteínas de fusão capazes de aumentar a solubilidade do peptídeo expresso e que são geradas a partir da expressão com pET-32a. Sendo assim essa construção deve conter epítomos semelhantes aos encontrados nas fosfolipases e metaloproteases ocasionando o reconhecimento cruzado com o soro ou ainda a anticorpos próprios do coelho que acabam tendo uma reação cruzada com proteína do veneno. Algo semelhante ao que é encontrado no caso das alergias a alimentos ou ainda no caso do sistema sanguíneo, onde anticorpos não específicos reconhecem epítomos e desencadeiam uma resposta não esperada no organismo (Branch, 2015; Pelz e Bryce, 2015)

Considerando as dificuldades encontradas na expressão e dobramento da U2-sicaritoxin-Lit2 durante os testes em bactéria, foram realizados teste de expressão em fungo leveduriforme *Pichia pastoris*. A utilização de *Pichia pastoris* para produção de proteínas recombinantes é muito descrita na literatura como por exemplo na expressão da notina de aranha  $\omega$ -hexatoxin-Hv1a fusionada a GNA que possui atividade inseticida sobre larvas de lepidópteros (Pyati *et al.*, 2014). *P. pastoris* também já foram utilizadas com sucesso na expressão de fosfolipases A2 de cobra e ainda porções de cadeia pesada de anticorpos contra toxina botulínica (Baghban *et al.*, 2014; Santos-Filho *et al.*, 2014). A estratégia de expressão do peptídeo recombinante em levedura *P. pastoris* está principalmente relacionado ao fato de elas possuírem o sistema de endomembranas como retículo endoplasmático e complexo de Golgi, que são as organelas responsáveis por realizar as modificações pós-traducionais nas proteínas. Para a espécie *Pichia pastoris* existem algumas cepas de expressão com diferentes características. No nosso trabalho foram testadas primeiramente duas cepas: X-33 que apresenta o fenótipo selvagem e na maioria das vezes é Mut<sup>+</sup> e a cepa KM71H que possui fenótipo Mut<sup>s</sup>. O fenótipo Mut está relacionado com a capacidade de consumo de metanol por essas leveduras, Mut<sup>s</sup> indica uma baixa taxa de utilização de metanol em contraposição ao fenótipo Mut<sup>+</sup> essa diferença ocorre pela disrupção do promotor para o gene de álcool oxidase I, o gênero *Pichia* possui o álcool oxidase I e II (Ellis *et al.*, 1985; Tschopp *et al.*, 1987).

Esses diferentes fenótipos podem influenciar na quantidade de proteína expressa e ainda no seu dobramento, por diminuir o estresse no retículo causado por uma alta taxa de síntese de proteína recombinante (Pedro *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015).

Os primeiros testes em X-33 mostraram um baixo rendimento de proteína recombinante por litro de expressão, associado ainda à presença de agregados por pontes dissulfeto. Wu e colaboradores (2012) demonstraram que a expressão em *P. pastoris* a 23°C é favorável pois aumenta a taxa de oxigenação do meio de cultura e, assim, uma maior quantidade de hemoglobina foi obtida. Segundo os mesmos autores a redução na temperatura durante a indução mostrou-se favorável na redução dos agregados por pontes dissulfeto. A expressão foi refeita e a temperatura da cultura durante a indução foi reduzida para 15°C, com o objetivo de favorecer o correto estabelecimento das pontes dissulfeto (Wu *et al.*, 2012). Também foi observado que a diminuição da temperatura não afetou o crescimento das culturas, uma vez que a D.O.<sub>600</sub> observada foi similar durante os quatro dias de indução em relação aos ensaios no qual a temperatura utilizada foi de 30° C. Essas estratégias não alteraram significativamente a produção da toxina o que nos levou a levantar a possibilidade da sequência não ser favorável para expressão em *P. pastoris* por possuir códons pouco frequentes para esse hospedeiro. Para tentar resolver essa questão foi realizada a otimização da sequência para expressão em *P. pastoris* pela empresa GenScript e, segundo a ferramenta de análise de sequências fornecida por eles, nossa sequência apresentava 4% de códons raros e um “Codon Adaptation Index (CAI)” de 0,69 onde o ideal para expressão seria superior a 0,8. A sequência contendo o pró-peptídeo foi otimizada contendo e apresentou um CAI= 0,88. Essa sequência foi transformada novamente em X-33 para um novo teste de expressão. Porém para o nosso peptídeo em estudo isso ainda não foi suficiente para aumentar o rendimento. A estratégia de otimizar códons da sequência a ser expressa é amplamente utilizada para proteínas obtidas em sistema de leveduras podendo aumentar a quantidade expressa em até cinco vezes sem alterar a biomassa durante a expressão e nem os níveis de RNAm (Hu *et al.*, 2013; Tu, 2013). A otimização de códons já foi usada com sucesso na expressão de toxinas de escorpião, agitoxin-2 (rAgTx2) e margatoxin (rMgTx), inibidoras de canais de potássio onde a expressão rendeu 12 e 18 mg/L respectivamente (Anangi *et al.*, 2012).

Levantamos a questão de que o pró-peptídeo poderia estar afetando o dobramento da toxina durante a expressão o que a levaria a ser degradada via proteossomos. Uma nova clonagem da sequência otimizada foi realizada em vetor pPICZαC agora da sequência sem pró-peptídeo e essa construção foi transformada em cepa KM71H. Também é descrito na literatura que *P. pastoris* rotineiramente expressam as proteínas recombinantes de forma corretamente dobradas porém, hiperglicosiladas como descrito para expressão de fosfatase acida tipo fitase de trigo e ainda de uma neuraminidase de vírus influenza (Dionisio *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012) Como era possível o fato da toxina estar sendo expressa de forma hiperglicosilada a expressão foi realizada na presença e na ausência de sorbitol. Kim e colaboradores (2007) descreveram que culturas de levedura hiperglicosilam menos as proteínas recombinantes quando a cultura apresenta outra fonte de carbono que não metanol, como o sorbitol, glicerol ou glicose (Kim, 2007; Nosedá *et al.*, 2013 (Kim, 2007 #133). A utilização da KM71H na ausência de sorbitol resultou na ausência de expressão, possivelmente pelas células de levedura utilizarem preferencialmente o açúcar ao invés do metanol. O baixo consumo de metanol pelas células resultou em baixa expressão do peptídeo, o que foi verificado pela não-detecção em SDS-PAGE corado com azul brilhante de Coomassie. A condição de expressão com 0,5% de metanol e sem sorbitol foi eficiente na expressão de U2-sicaritoxin-Lit2, porém quanto ao rendimento continuou a ser insatisfatório, não chegando a 1 mg/L de cultura.

A expressão de toxinas ricas em cisteínas do veneno de aranha ainda é uma coisa pouco explorada em *Pichia pastoris*. Dos artigos publicados alguns utilizam biorreator e ainda usam lectina fusionada a toxina chegando a obter ~50 mg/L de cultura (Fitches *et al.*, 2012), ou ainda utilizam *Saccharomyces cerevisiae* ao invés de *Pichia pastoris* (Hughes *et al.*, 2008; Rong *et al.*, 2011 (Hughes, 2008 #136). Também há relatos da expressão em *P. pastoris* da expressão de uma neurotoxina Huwentoxin-I que rendeu ~80 mg/L de cultura, porém esta toxina não se mostrou ativa em ensaios biológicos. Como alternativa, a mesma toxina foi expressa em células de inseto Sf9 no sistema de baculovirus rendendo ~900 µg/L de toxina ativa (Ji *et al.*, 2005). Uma alternativa na produção de peptídeos de veneno é síntese química onde os peptídeos são produzidos “in vitro”, essa técnica é muito utilizada para produção de peptídeos do caramujo marinho *Conus* (Khoo *et al.*, 2012; Vetter *et al.*, 2012). Isso só é possível porque a grande maioria desses peptídeos possuem no máximo 30



aminoácidos e no máximo 3 pontes dissulfeto, características essas que estão no limite da técnica, pois quanto maior a cadeia peptídica menor a eficiência da síntese e quanto mais pontes dissulfeto mais complexo é obtê-las corretamente. Como a U2-sicaritoxin-Lit2 possui cinco pontes dissulfeto e a forma madura é composta por 48 aminoácidos torna inviável produzi-la por síntese química (Paradis-Bas *et al.*, 2015; Raibaut *et al.*, 2015).

Com o objetivo de melhorar o rendimento das expressões em *P. pastoris* para que pudessem ser realizados os testes de atividade biológica foram tentadas outras estratégias de expressão. Com base nisso o teste de *western blotting* de colônia ajudaria a identificar as colônias que mais produzem o peptídeo de interesse: quanto mais forte a marcação, mais peptídeo teria sido produzido como mostrado na seleção de clones na expressão de receptores acoplados a proteína G em que o uso dessa técnica possibilitou a obtenção de até 10 mg/L de proteína recombinante (Krettler *et al.*, 2013). O laboratório estava envolvido em um grande esforço para produção de toxinas em *P. pastoris*, contando com quatro diferentes toxinas expressas em quatro cepas diferentes cada, e ainda algumas diferenças de construção, como proforma ou forma madura. Essas diferentes construções estão representadas no *western blotting* de colônia e apresentaram diferentes resultados desde uma fraca marcação até colônias bem marcadas. Porém foi observada uma fraca marcação nos controles negativos o que pode ser explicado por uma reação cruzada entre o anticorpo secundário utilizado e proteínas secretadas ou presentes nas membranas das leveduras. Outro fato a ser destacado foi que a colônia de SMD1168H que apresentou ótimo resultado de rendimento na expressão (~5 mg/L) apresentou uma fraca marcação no W.B. de colônia usando o anticorpo anti 6HisTag como anticorpo primário. Esse resultado foi obtido utilizando-se o modelo de expressão em alta densidade de células, simulando o protocolo de expressão em biorreator onde a densidade de células na cultura e a quantidade de proteína expressa são maiores (Zepeda *et al.*, 2014; Zhan *et al.*, 2014). A maioria dos artigos científicos que abordam expressão em *P. pastoris* não descrevem em detalhes esses testes de padronização e de seleção de clones. Sendo assim não existem muitos dados para que possamos comparar os resultados obtidos com a literatura da área. O que podemos inferir é que o crescimento e expressão de peptídeos em meio sólido é consideravelmente diferente do que ocorre em meio líquido.

Outra tentativa de selecionar clones que expressassem mais peptídeo recombinante foi o teste de seleção de clones multicópia por aumento na concentração de antibióticos. Nesse teste os resultados foram mais evidentes, as colônias apresentaram taxas de crescimento bem diferentes. Nesse teste esperava-se que as colônias que crescessem mais, expressassem mais peptídeo, considerando que a maior resistência estaria associada a inserção de várias cópias do cassete de expressão e resistência. As colônias de SMD1168H foram escolhidas para teste de expressão e o fato da colônia de menor crescimento em 500 µg de zeocina ter apresentado melhor expressão pode ser explicado por vários fatores como o fato do maior número de cópias do cassete sobrecarregar a maquinaria de dobramento do retículo e/ou da via de secreção de proteínas ou a até a perda do cassete de expressão em altas concentrações (Marx *et al.*, 2009) (Khan *et al.*, 2013).

A falta de atividade biológica pode estar relacionada a diversos fatores entre eles o modelo (insetos) testado que podem ser pouco sensíveis a toxina injetada, uma vez que se sabe que diferentes animais apresentam diferentes sensibilidades a toxinas como de *Bacillus thuringiensis* em plantas transgênicas ou inclusive resistência a inseticidas como piretróides (Yang *et al.*, 2014; Fabrick *et al.*, 2015; Tay *et al.*, 2015). Outro fator pode ser o dobramento que pode estar incorreto, pois é retratado na literatura que nem sempre *P. pastoris* é capaz de expressar proteínas ou enzimas no seu correto dobramento, podendo ocorrer o acúmulo de proteínas mal dobradas o que pode levar a morte e lise das células de levedura, ou ainda erros no processo de glicosilação que gera proteínas sem atividade (Tawde, Mangala D. e Freimuth, Paul, 2012; Kukk *et al.*, 2014).

A expressão em eucarioto como *Pichia pastoris* pode ser ineficiente algumas vezes para expressão, pois o retículo endoplasmático pode sofrer uma sobrecarga e as pontes dissulfeto podem estar sendo mal formadas, ou a indução da expressão leva a lise das células acarretando em toxicidade para a cultura prejudicando a qualidade do produto expresso (Tawde, M. D. e Freimuth, P., 2012; Hesketh *et al.*, 2013). Isso pode resultar na falta de atividade biológica do peptídeo expresso quando injetado nos insetos. Outra teoria para a falta de atividade é a presença da porção C terminal do vetor na toxina expressa, uma vez que o pPICZaC produz o peptídeo fusionado ao epítipo C-myc e a cauda de histidinas (fig. 19) o que pode afetar a interação toxina canal iônico por alterar a superfície exposta do peptídeo. Dos motivos

apresentados acreditamos que o mais provável seja a presença da porção C-terminal estar atrapalhando a interação com o canal iônico. Uma vez que essas toxinas são peptídeos e a atividade é dependente da exposição de alguns resíduos de aminoácidos específicos como os aromáticos ou com carga, os quais podem se encontrar ocultos devido a interferência pela porção C-terminal extra conferida pelo vetor pPICZaC utilizado pra expressão (Yang *et al.*, 2014) (Huang *et al.*, 2014) (Luo *et al.*, 2014).

A produção de toxinas da família das notinas recombinantes em sistema heterólogos é um processo laborioso, e na maioria das vezes, improdutivo e incerto como já observado. Os testes realizados no Brasil não geraram uma toxina com atividade biológica, mesmo quando a toxina foi expressa em diferentes modelos como bactérias e leveduras. Porém com a realização do estágio de doutorado-sanduiche na Austrália, sob co-orientação do Prof. Dr. Glenn King no *Institute for Molecular Bioscience*, na University of Queensland. Contando com uma estrutura especializada na produção de peptídeos da família das notinas, foi possível alcançar o objetivo geral do projeto, porém não com a toxina originalmente proposta. Não foi possível obter a U2-SCRTX-Lit2 recombinante, mas foi possível obter e testar outras três toxinas: a U2-SCRTX-Lit1b, a U1-SCRTX-Lit1a e a U1-SCRTX-Lit1b.

Os primeiros experimentos foram realizados com a U2-SCRTX-Lit2 onde o gene sintético com códons otimizados para expressão foi adquirido comercialmente. A expressão da U2-SCRTX-Lit2 em bactéria cepa BL21(DE3) foi realizada em diferentes condições a fim de se obter a melhor condição de expressão. Foi observado que a toxina fusionada a MBP apresentou uma baixa solubilidade após a lise das bactérias, sendo que a melhor condição para expressão foi em baixa temperatura (16° C) com 0,25 mM de agente indutor IPTG em tempo de 16 horas, sendo essa condição adequada para quando alguma proteína apresenta baixa solubilidade (Berrow *et al.*, 2006; Klint *et al.*, 2013). A purificação em coluna de Ni-NTA foi eficiente, onde a toxina fusionada a MBP foi obtida de maneira eficiente com poucos contaminantes como esperado para purificação usando esse tipo de resina. A clivagem da toxina da sua etiqueta de solubilidade (MBP) foi realizada com a protease TEV, a construção do plasmídeo foi feita de tal maneira que o sitio de clivagem da TEV tivesse como seu último aminoácido o primeiro da U2-SCRTX-Lit2. Nesse caso o aminoácido utilizado é uma alanina, que já foi descrito como sendo o

terceiro melhor aminoácido nessa posição para reconhecimento e clivagem da TEV (Kapust *et al.*, 2002). Porém o que foi observado foi uma eficiência reduzida na clivagem, onde o produto clivado foi em torno de 50% do total da toxina e isso provavelmente é decorrente do uso da alanina na posição P1 no sitio da TEV.

Após a purificação em resina de níquel e clivagem com protease TEV a purificação foi feita em RP-HPLC usando coluna semipreparativa C18, porém não foi possível realizar a purificação por esse método. Diversas tentativas e condições foram testadas a fim de tentar obter a toxina purificada, porém em todas as tentativas não foi obtido uma fração referente à toxina, apenas o pico referente a MBP foi obtido. Esse fato pode ser devido a inúmeros fatores, como a incapacidade da toxina em se ligar por interações hidrofóbicas a matriz da coluna, ou a presença de múltiplas conformações da toxina devido à dificuldade de dobramento e formação da pontes dissulfeto durante a expressão em bactérias, resultando na não obtenção da toxina na forma de um pico (Arolas *et al.*, 2006). Levantou-se a possibilidade da toxina estar precipitando antes da realização da purificação por RP-HPLC devido à adição de TFA na amostra antes da purificação. TFA funciona como agente pareador de íons, fazendo com que os peptídeos e proteínas se liguem mais eficientemente a matriz da coluna (Pearson e McCroskey, 1996). O TFA também causa a redução do pH da solução e essa acidificação causa a precipitação do excesso de MBP da solução, ajudando assim a não saturar a coluna usada. Foi observado através de SDS-PAGE que essa acidificação do meio e precipitação da MBP, não causou uma completa precipitação da U2-SCRTX-Lit2 da solução, mostrando assim que a toxina se encontrava presente no momento da purificação em RP-HPLC. A presença e a identidade da toxina foram comprovadas com realização de espectrometria de massas tipo MALDI-TOF onde foi obtido um sinal de massa monoisotópica de 5277,44, o que é condizente com a massa esperada para a toxina recombinante contendo as cisteínas oxidadas. A técnica de MALDI para caracterização da composição peptídica de venenos já foi descrita anteriormente apresentando bons resultados. Para o veneno de tarântulas foi possível diferenciar a composição dos venenos entre machos e fêmeas na quantidade de diferentes peptídeos encontrados em cada um (Palagi *et al.*, 2013). Para o veneno de caramujo marinho de nove espécimes foram obtidos 5517 sinais únicos de massa expandindo assim o acervo de peptídeos conhecidos e gerando melhores bibliotecas para descobrimento de

moléculas de interesse biológico ou farmacológico (Rodriguez *et al.*, 2015). Além desses venenos, Touchard e colaboradores (2015) analisaram os venenos de 82 espécies de formiga por MALDI-TOF, o que revelou uma presença de 50 a 70 peptídeos por veneno, uma quantidade muito menor em relação aos 800 peptídeos encontrados no veneno de tarântula (Palagi *et al.*, 2013; Touchard *et al.*, 2015)

Para a U2-SCRTX-Lit1b a expressão foi muito mais eficiente, a construção apresentou uma ótima solubilidade onde a maior parte da toxina apresentava-se solúvel mesmo realizado a expressão à 30°C por 4 horas com 0,5 mM IPTG. A U2-SCRTX-Lit1b possui como o primeiro aminoácido uma glicina, aminoácido esse também descrito como eficiente para composição do sitio da TEV na posição P1 (Kapust *et al.*, 2002). A clonagem foi realizada de maneira que após a clivagem a toxina obtida não possuísse nenhum resíduo extra devido ao fato de se utilizar a glicina da U2-SCRTX-Lit1b como componente do sitio da TEV. Essa abordagem foi eficiente, pois a clivagem apresentou uma eficiência de ~90% muito superior aos 50% obtidos na clivagem da U2-SCRTX-Lit2 contendo uma alanina no sitio de clivagem. A utilização da coluna C18 no RP-HPLC para separação da MBP da toxina também foi eficiente, o pico obtido teve o sinal de massas em ESI-MS compatível com a toxina recombinante, passo esse que não foi possível realizar com a U2-SCRTX-Lit2. Quando a fração obtida da U2-SCRTX-Lit1b em RP-HPLC semipreparativa foi analisada em coluna analítica, foi observada a presença de diferentes conformações da toxina, porém não foi possível realizar a separação dessas conformações nessa coluna. Para isso optamos por usar a coluna HILIC que faz a separação dos peptídeos por interação hidrofílica com a matriz da coluna, usando um gradiente de concentração de solvente reverso quando comparado com o RP-HPLC padrão, que já foi demonstrado como eficiente na separação de outras substâncias como cocaína e seus metabolitos do plasma sanguíneo, também com resultados superiores ao RP-HPLC padrão (D'avila *et al.*, 2016).

A utilização coluna HILIC permitiu uma separação eficiente entre as conformações encontradas na expressão da U2-SCRTX-Lit1b. Foram obtidos dois picos que apresentavam conformações diferentes e uma região condizente com a toxina sem conformação como mostrados nos gráficos de HSQC. A presença dessas duas conformações observadas com dobramento poderia ser fruto da presença de prolinas na toxina, uma vez que prolinas apresentam conformações *cis* e *trans*

mudando assim o dobramento da toxina recombinante (Lu, 1999; Rosengren *et al.*, 2002). A prolina é o aminoácido natural com a menor barreira de energia para isomerização, fazendo com que ela assuma a forma *cis* mais facilmente que qualquer outro aminoácido natural (Lin *et al.*, 2015). No caso das frações coletadas no RP-HPLC deveria haver um equilíbrio dinâmico entre as conformações, de modo que após coletar-se um desses picos, quando ele fosse reanalisado em RP-HPLC, deveriam aparecer novamente os dois picos, fato esse que não ocorreu (dado não mostrado).

As frações coletadas tiveram suas atividades biológicas testadas em moscas (*L. cuprina*) e o resultado foi que a fração número 1 apresentou atividade de paralise sobre moscas com uma  $PD_{50} = 837 \pm 23$  pmol/g em uma hora após a injeção. Isso classifica a U2-SCRTX-Lit1b como toxina moderadamente inseticida, duas vezes mais potente que U2-segestritoxin-Sf1a e muito semelhante a  $\mu$ -cyrtautoxin-As1a e menos potente que  $\mu$ -Diguetoxin-Dc1a que possui uma  $PD_{50} = 13$  pmol/g essas toxinas tiveram suas atividades testadas no mesmo modelo biológico (Bende *et al.*, 2013; Bende *et al.*, 2015). A paralise observada nas moscas não foi reversível para as maiores doses mesmo após 72 horas da injeção, havendo óbito das moscas por inanição. Essa toxina possui similaridade com toxinas de aranha que agem sobre canais de sódio voltagem dependente (De Castro, C. S. *et al.*, 2004; Matsubara *et al.*, 2013). A maioria das toxinas de aranha que agem sobre  $Na_v$ , agem como “gate modifiers” alterando o potencial e ação dessas células excitáveis, levando a um fenótipo flácido ou depressivo nos insetos (Bende *et al.*, 2015). Porém o que foi observado para a U2-SCRTX-Lit1b foi uma paralise contrátil nas moscas possivelmente algo similar a paralise excitatória descrita para algumas toxinas (Windley *et al.*, 2012). Paralise excitatória é causada por diversas toxinas como por exemplo a  $\mu$ -agatoxin-Aa1 da aranha *Agelenopsis aperta* que é uma das toxinas moduladoras de canais  $Na_v$  de inseto mais potentes. Essa toxina causa uma paralise convulsiva decorrente da despolarização repetitiva nos axônios, levando a uma liberação espontânea de neurotransmissores (Adams *et al.*, 1989).

Para a atividade em canais iônicos de vertebrados, a toxina foi testada pelo método de FLIPR, onde a toxina teve sua capacidade de bloquear os subtipos 1.7 e 2.2 de canais de sódio e cálcio, respectivamente. Isso mostrou que a U2-SCRTX-Lit1b possui uma baixa afinidade por esses canais, pois a concentração de inibição

IC<sub>50</sub> ficou em 29,26 µM para Nav 1.7 e 80,86 µM para Cav 2.2. Algumas outras toxinas de aranha possuem IC<sub>50</sub> para Nav 1.7 muito menores que as determinadas a para a U2-SCRTX-Lit1b, como a µ-theraphotoxin-Tp1a IC<sub>50</sub>= 2,5 nM e µ-theraphotoxin-Hhn1b IC<sub>50</sub>= 21,0 nM. Já a M-theraphotoxin-Gr1a IC<sub>50</sub>= 7,4 µM possui uma IC<sub>50</sub> mais próxima a U2-SCRTX-Lit1b (Xiao e Liang, 2003; Redaelli *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2015). Os valores de IC<sub>50</sub> da U2-SCRTX-Lit1b determinados para Cav 2.2 também são muito superiores aos conhecidos para outras toxinas como ω-AGTX-Aa2a e ω-segestritoxin-Sf1a com IC<sub>50</sub>= 10 nM e toxinas de aranha armadeira (*P. negriventer*) como ω-ctenitoxin-Pn3a e ω-ctenitoxin-Pn4a com IC<sub>50</sub>= 50,0 e 136,0 nM respectivamente (Newcomb *et al.*, 1995; Miranda *et al.*, 1998; Vieira *et al.*, 2003; Adams, 2004). O interesse sobre a atividade em Nav 1.7 é devido a esse canal ser considerado um amplificador para o sinal de dor em humanos. Portanto, inibidores de Nav 1.7 possuem grande potencial para desenvolvimento de novas drogas analgésicas (Klint *et al.*, 2015). Já para o canal de cálcio 2.2 ele está envolvido com o influxo de cálcio em resposta ao potencial de membrana, e envolvido nos processos de excitação neuronal, contração muscular, expressão gênica e secreção de hormônios (Ogiyama *et al.*, 2015). Mas a característica mais marcante para o Cav 2.2 para o nosso estudo, é o fato de estar muito presente nos axônios de sistema neuronal periférico e central. Além disso eles estão fortemente relacionados com os processos de isquemia cerebral e dor neuropática (Mollica *et al.*, 2015). Junto com o canal de sódio eles são ótimos alvos para desenvolvimentos de novas drogas analgésicas. A baixa atividade da U2-SCRTX-Lit1b sobre canais iônicos de mamíferos pode ser interpretada de outra maneira, com um bom potencial para um novo agente pesticida já que possui uma atividade de parálise irreversível em insetos.

Para a determinação da estrutura tridimensional da U2-SCRTX-Lit1b usamos RMN, isso se deve ao fato de peptídeos ricos em cisteína possuírem uma certa flexibilidade e baixa massa molecular, portanto, são geralmente muito difíceis de serem cristalizados para posteriores análises de difração de raios-X (Mobli e King, 2010). Das estruturas de toxinas de aranhas depositadas no PDB, mais de 95% delas foram resolvidas por RMN (Berman *et al.*, 2000). Usando essa metodologia fomos capazes de determinar a estrutura da U2-SCRTX-Lit1b com grande precisão, a estrutura mostra a presença de 5 pontes dissulfeto. Em busca no Arachnoserver, existem 41 toxinas depositadas que possuem entre 3 e 4 pontes dissulfeto com

estrutura depositada no PDB. Não há até o momento nenhuma estrutura resolvida com mais de 4 pontes dissulfeto. Portanto, essa é primeira estrutura com cinco pontes resolvidas.

As análises por RMN usando HSQC foram usadas para demonstrar se os picos do RP-HPLC representavam toxinas em alguma conformação específica e ainda como se comportavam quanto à estabilidade, uma vez que essa é uma técnica amplamente utilizada para detecção dos grupos amino (Ying *et al.*, 2014). Os dois principais picos obtidos no RP-HPLC eram referentes à toxina dobrada, porém de diferentes maneiras, e a terceira região era referente à toxina não-dobrada, como mostrados nos gráficos de HSQC. Os experimentos de HSQC foram realizados com o peptídeo expresso contendo N<sup>15</sup> por realçar o sinal obtido no RMN. Uma vez que a toxina pertence à família da ICKs que possuem folhas betas em suas estruturas, o gráfico do HSQC esperado seria com pontos dispersos por toda a área (Kwan *et al.*, 2011). Por outro lado, quando os picos se encontram agrupados na área central do gráfico isso indica a falta de conformação do peptídeo como mostrado na figura 27 (Bieri *et al.*, 2011). O comportamento da toxina também foi testado quanto a estabilidade térmica para coleta de dados, onde a temperatura foi alterada (18°C; 25°C e 40°C, dados não mostrados). Foi observado um certo deslocamento na posição dos picos, porém não houve uma melhor resolução ou estabilidade na coleta de dados. Quanto a coleta de dados em diferentes pHs, teoricamente é possível fazê-la em uma gama de diferentes pHs, de tal modo que a estabilidade da toxina pode ser alterada. Normalmente pHs inferiores a 2,6 e maiores que 7,5 são evitados pois eles tendem a gerar espectros com menor qualidade (Kwan *et al.*, 2011). Dos pHs testados, a toxina apresentou o melhor resultado para coleta de dados em tampão acetato pH 5, onde os picos obtidos tiveram boa resolução, dispersão e baixa presença de ruído.

Com a determinação da estrutura por RMN foi possível também determinar as pontes dissulfeto da U2-SCRTX-Lit1b. O padrão de ligação das cisteínas é algo importante nas notinas, como por definição o motivo estrutural possui 3 pontes, mas podem possuir até 7 (Souza *et al.*, 2012a), esse padrão de conectividade muda os resíduos expostos em cada alça da toxina. O padrão típico de conectividade é descrito como C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> e C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> para as toxinas com 3 pontes (Gelly *et al.*, 2004; Gracy *et al.*, 2008). Esse padrão pode ser alterado quando há mais cisteínas na sequência,



como C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> no caso de existência de 4 pontes (Vassilevski *et al.*, 2009). Para a U2-SCRTX-Lit1b o padrão observado foi C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub>, C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub> o que difere do predito para quando existe cinco pontes dissulfeto C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>9</sub> e C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> descritos na literatura (Zhang *et al.*, 2015). A estrutura foi determinada a partir da toxina recombinante, não possuímos a informação da toxina nativa que pode apresentar um padrão de conectividade diferente do observado na recombinante. Porém, pelo fato da toxina recombinante possuir atividade biológica e essa ser associada à correta estrutura e conformação dessa classe de toxinas isso nos leva a supor que essa é a conformação correta da toxina. O correto dobramento da toxina leva a exposição de resíduos-chaves para atividade em cada alça, a exposição de aminoácidos aromáticos, e com carga é algo reconhecidamente importante para atividade das notinas (Wang *et al.*, 2004). A U2-SCRTX-Lit1b apresenta 3 resíduos aromáticos sendo um triptofano e duas tirosinas em sua sequência primária, uma outra isoforma da U2-SCRTX-Lit1b descrita por de Castro *et al.* 2004, mostra a presença de mais uma tirosina na posição 5 da sequência onde a toxina apresentada nesse trabalho possui uma serina. A isoforma testada por de Castro e colaboradores teve sua atividade inseticida testada em larvas de *Spodoptera frugiperda*, e foi comprovada como causadora de paralise flácida nessas larvas, sua PD<sub>50</sub> não chegou a ser estabelecida, não possuímos dados para comparação entre as duas isoformas. Outros aminoácidos importantes na interação toxina-canal são lisinas e argininas como mostrado para interação com canais de potássio onde dependendo da posição que se encontram podem ocluir eletrostaticamente a passagem de íons (Bhuyan e Seal, 2015). A U2-SCRTX-Lit1b possui 5 lisinas e 4 argininas distribuídas ao longo da sequência, a presença desses resíduos junto com a atividade biológica corroboram com a ideia de que a estrutura determinada está correta.

Outras isoformas de toxinas do veneno de *L. intermedia*, pertencentes às famílias das LiTx1 e LiTx2, mais especificamente as U1-SCRTX-Lit1a e U1-SCRTX-Lit1b descritas por de Castro e col. 2004 foram escolhidas para expressão e testes de atividade biológica. Para as expressões realizadas com as U1-SCRTX-Lit1a e U1-SCRTX-Lit1b a solubilidade geral das construções foi mais baixa quando comparada com a U2-SCRTX-Lit1b e superiores a obtida para U2-SCRTX-Lit2, nas mesmas condições. Todas as toxinas potencialmente inseticidas caracterizadas como ICKs

descritas no transcriptoma realizado por Gremski e colaboradores em 2010, possuem 10 cisteínas na sua sequência aminoacídica madura. Essa grande quantidade de cisteínas é um fator que dificulta a expressão recombinante e a síntese química dessas toxinas devido à grande complexidade na formação correta das pontes dissulfeto, sendo necessárias muitas vezes técnicas *in vitro* para redobrar esses peptídeos. (Da Silva *et al.*, 2009; Bae *et al.*, 2012). Para a purificação foram usadas duas técnicas como para as outras toxinas, primeiramente com cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA seguido de RP-HPLC. Com a primeira foi possível obter a toxina fusionada a MBP com poucos contaminantes, permitindo assim a realização da clivagem com TEV protease. A abordagem de adicionar uma serina no início das sequências das toxinas, auxiliou na eficiência da clivagem com protease TEV, onde a clivagem apresentou uma eficiência de mais de 90% devido a eficiência desse aminoácido em compor o sítio de restrição (Kapust *et al.*, 2002). Esse produto foi então purificado por RP-HPLC usando coluna C4 semipreparativa, onde foi realizada a separação entre as toxinas e a etiqueta MBP. A fração de toxinas foi repurificada em RP-HPLC usando coluna HILIC que revelou a presença de diversas conformações para ambas as toxinas. Essas conformações foram mais predominantes nas U1-SCRTX-Lit1a e U1-SCRTX-Lit1b do que na U2-SCRTX-Lit1b, a U2-SCRTX-Lit1b apresentou basicamente duas conformações e uma terceira fração sem dobramento. As U1-SCRTX-Lit1a e U1-SCRTX-Lit1b apresentaram uma pior definição entre os picos, com uma sobreposição maior entre as conformações similar ao encontrado nas frações durante o redobrimento da HWTX-IV sintética (Deng *et al.*, 2013). Essa grande quantidade de conformações reduziu o rendimento de toxina ativa por litro de cultura especialmente para a U1-SCRTX-Lit1b.

As U1-SCRTX-Lit1a e U1-SCRTX-Lit1b já haviam sido descritas como causadoras de paralise flácida em larvas de *Spodoptera frugiperda* (De Castro, C. S. *et al.*, 2004). Esse teste foi realizado com a toxina nativa purificada do veneno, nossa abordagem durante o doutorado foi com toxinas recombinantes. Ambas as toxinas apresentaram atividade de paralise em moscas varejeiras quando injetadas, sendo que a U1-SCRTX-Lit1a apresentou-se como a toxina menos potente testada nesse trabalho. A PD<sub>50</sub> observada para essa toxina a coloca entre as quinze toxinas com PD<sub>50</sub> menor que 1500 pmol/g depositadas no Arachnoserver. Já para a U1-SCRTX-Lit1b o resultado foi mais satisfatório, onde a toxina apresentou uma PD<sub>50</sub> que a

coloca no grupo das onze mais potentes toxinas segundo pesquisa no ArachnoServer (Herzig *et al.*, 2011). Outra característica apresentada pela U1-SCRTX-Lit1b foi sua alta letalidade em moscas, a LD<sub>50</sub> encontrada a coloca no grupo com as 33 toxinas mais letais sem considerar o modelo testado (Herzig *et al.*, 2011). Quando o modelo testado é levado em conta ela apresenta-se como a toxina mais letal para moscas ficando à frente da  $\mu$ -Diguetoxin-Dc1a que possui LD<sub>50</sub>= 231,0 pmol/g valor próximo dos 213,0 pmol/g observados para a U1-SCRTX-Lit1b. Esses valores são diferentes para diferentes modelos, a  $\mu$ -Diguetoxin-Dc1a possui uma LD<sub>50</sub>= 493.0 pmol/g quando injetada em *Musca domestica* (Bende *et al.*, 2014).

Com base nos resultados mostramos a que produção de peptídeos inseticidas recombinantes do veneno de *L. intermedia*, são possíveis, e apresentam um potencial inseticida relevante para continuarmos os estudos nessa área. De posse das toxinas recombinantes, podemos realizar mais testes biológicos e biofísicos com o intuito de determinar a eficiência dessas toxinas frente a larvas de interesse econômico. Isso pode ser expandido inclusive para a expressão da toxina em plantas visando protejelas da predação por larvas de insetos.

## 6 Conclusão

Nesse trabalho conseguimos:

- Realizar a clonagem e expressão das toxinas U2-SCRTX-Lit2, U2-SCRTX-Lit1b, U1-SCRTX-Lit1a e U1-SCRTX-Lit1b em diferentes modelos de expressão.
- Determinamos a atividade biológica como inseticida para moscas das toxinas U2-SCRTX-Lit1b, U1-SCRTX-Lit1a e U1-SCRTX-Lit1b.
- Conseguimos determinar a primeira estrutura tridimensional de uma ICK com cinco pontes dissulfeto por RMN, da toxina U2-SCRTX-Lit1b.

Trabalhar com biologia molecular em especial com peptídeos e proteínas recombinantes possui alguns desafios técnicos difíceis de serem superados. Foram testadas e analisadas diversas condições a fim de se obter as toxinas recombinantes, tanto em bactérias como em leveduras. Obtivemos sucesso em três das quatro toxinas testadas. As três toxinas possuem atividade de paralise sobre moscas, sendo a mais potente U1-SCRTX-Lit1b seguida pela U2-SCRTX-Lit1b e depois pela U1-SCRTX-Lit1a. A letalidade observada para U2-SCRTX-Lit1b e U1-SCRTX-Lit1a foram baixas, porém a U1-SCRTX-Lit1b pode ser considerada como potente. Fomos ainda capazes de resolver a estrutura da primeira notina com cinco pontes dissulfeto da literatura, estrutura essa que mostrou um padrão de ligação entre as cisteínas que difere do que era predito para notinas com cinco pontes. A realização do estágio no exterior foi muito proveitosa para a realização do projeto, foram alcançados bons resultados na parte experimental e ainda foram formados laços para futuras colaborações entre o grupo australiano do professor Glenn King e também do grupo norte americano do professor Frank Bosmans. Como perspectivas, estão faltando alguns dados de eletrofisiologia que estão sendo desenvolvidos pelo professor Frank Bosmans, assim que possuímos esses dados será realizada a elaboração de mais dois artigos científicos. A realização desse trabalho agrega mais um pouco de conhecimento ao fantástico mundo dos venenos animais bem como nos permite compreender melhor a fração peptídica que compõe o veneno de *L. intermedia*.

## 7 Referências

ADAMS, M. E. Agatoxins: ion channel specific toxins from the American funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. **Toxicon**, v. 43, n. 5, p. 509-25, Apr 2004. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101.

ADAMS, M. E.; HEROLD, E. E.; VENEMA, V. J. Two classes of channel-specific toxins from funnel web spider venom. **J Comp Physiol A**, v. 164, n. 3, p. 333-42, Jan 1989.

ANANGI, R. et al. Recombinant Expression of Margatoxin and Agitoxin-2 in *Pichia pastoris*: An Efficient Method for Production of K(V)1.3 Channel Blockers. **PLoS ONE**, San Francisco, USA, v. 7, n. 12, p. e52965, 12/26

07/04/received

11/26/accepted 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3530466/>>.

APPEL, M. H. et al. Insights into brown spider and loxoscelism. **ISJ**, v. 2, p. 152-8, 2005.

APPEL, M. H. et al. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochim Biophys Acta**, v. 1780, n. 2, p. 167-78, Feb 2008. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18082635](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18082635)>.

AROLAS, J. L. et al. Folding of small disulfide-rich proteins: clarifying the puzzle. **Trends Biochem Sci**, v. 31, n. 5, p. 292-301, May 2006. ISSN 0968-0004 (Print)

0968-0004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16600598> >.

BAE, C. et al. High Yield Production and Refolding of the Double-Knot Toxin, an Activator of TRPV1 Channels. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51516, 2012. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051516>>.

BAGAL, S. K. et al. Voltage gated sodium channels as drug discovery targets. **Channels**, v. 9, n. 6, p. 360-366, 2015/11/02 2015. ISSN 1933-6950. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1080/19336950.2015.1079674>>.

BAGHBAN, R. et al. Camelid-derived heavy chain nanobody against *Clostridium botulinum* neurotoxin E in *Pichia pastoris*. **Biotechnol Appl Biochem**, Mar 26 2014. ISSN 0885-4513.

BENDE, N. S. et al. The insecticidal spider toxin SFI1 is a knottin peptide that blocks the pore of insect voltage-gated sodium channels via a large  $\beta$ -hairpin loop. **FEBS Journal**, v. 282, n. 5, p. 904-920, 2015. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/febs.13189> >.

BENDE, N. S. et al. A distinct sodium channel voltage-sensor locus determines insect selectivity of the spider toxin Dc1a. **Nat Commun**, v. 5, p. 4350, 2014. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25014760> >.

BENDE, N. S. et al. The insecticidal neurotoxin Aps III is an atypical knottin peptide that potently blocks insect voltage-gated sodium channels. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 10, p. 1542-1554, 5/15/2013. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295213001536> >.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, January 1, 2000 2000. Disponível em: < <http://nar.oxfordjournals.org/content/28/1/235.abstract> >.

BERROW, N. S. et al. Recombinant protein expression and solubility screening in Escherichia coli: a comparative study. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 62, n. Pt 10, p. 1218-26, Oct 2006. ISSN 0907-4449 (Print)

0907-4449 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17001098> >.

BHUYAN, R.; SEAL, A. Molecular dynamics of Kv1.3 ion channel and structural basis of its inhibition by scorpion toxin-OSK1 derivatives. **Biophys Chem**, v. 203-204, p. 1-11, Aug-Sep 2015. ISSN 1873-4200 (Electronic)

0301-4622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26001067> >.

BIERI, M. et al. Macromolecular NMR spectroscopy for the non-spectroscopist: beyond macromolecular solution structure determination. **FEBS J**, v. 278, n. 5, p. 704-15, Mar 2011. ISSN 1742-4658 (Electronic)

1742-464X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21214861> >.

BOMMER, U. A.; THIELE, B. J. The translationally controlled tumour protein (TCTP). **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 3, p. 379-385, 2004. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0347480218&partnerID=40&md5=ffa1067cb61e06213de146a0200fdb17> >.

BRANCH, D. R. Anti-A and anti-B: what are they and where do they come from? **Transfusion**, v. 55 Suppl 2, p. S74-9, Jul 2015. ISSN 0041-1132.

BRUCE, C. et al. Recombinant conotoxin, TxVIA, produced in yeast has insecticidal activity. **Toxicon**, v. 58, n. 1, p. 93-100, 2011. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010111001760> >.

BÜCHERL, W. As Aranhas. **Edart, Livraria Editora Ltda São Paulo**, 1972.

CARDOSO, F. C. et al. Identification and Characterization of ProTx-III [ $\mu$ -TRTX-Tp1a], a New Voltage-Gated Sodium Channel Inhibitor from Venom of the Tarantula *Thrixopelma pruriens*. **Mol Pharmacol**, v. 88, n. 2, p. 291-303, Aug 2015. ISSN 0026-895x.

CATTERALL, W. A. Voltage-gated calcium channels. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 8, p. a003947, Aug 2011.

CATTERALL, W. A.; GOLDIN, A. L.; WAXMAN, S. G. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 4, p. 397-409, Dec 2005. ISSN 0031-6997 (Print)

0031-6997.

CHAIM, O. M. et al. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 211, n. 1, p. 64-77, Feb 15 2006. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16005484](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16005484) >.

CHANG, S. C. et al. Expression and isotopic labelling of the potassium channel blocker ShK toxin as a thioredoxin fusion protein in bacteria. **Toxicon**, v. 60, n. 5, p. 840-850, 10// 2012. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101011200493X> >.

CHAVES-MOREIRA, D. et al. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 107, n. 4, p. 655-666, 2009. ISSN 1097-4644. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.22148> >.

CHEEK, S.; KRISHNA, S. S.; GRISHIN, N. V. Structural classification of small, disulfide-rich protein domains. **J Mol Biol**, v. 359, n. 1, p. 215-37, May 26 2006. ISSN 0022-2836 (Print)

0022-2836 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16618491](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16618491) >.

CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 1, p. 12-21, Jan 2010. ISSN 0907-4449.

CHUANG, R. S. I. et al. Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. **Nature Neuroscience**, v. 1, n. 8, p. 668-674, 1998. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0032249498&partnerID=40&md5=1d861f142b9263e9c3033d0b93e3ffe5> >.

CORZO, G. et al. Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrothele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel. **FEBS Letters**, v. 547, n. 1-3, p. 43-50, 2003. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579303006665> >.

CRAIK, D. J. et al. Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, n. 5, p. 1327-1336, 1999. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283699933831> >.

D'AVILA, F. B. et al. Analysis of cocaine/crack biomarkers in meconium by LC-MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1012-1013, p. 113-117, 2/15/ 2016. ISSN 1570-0232. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023216300198> >.

DA SILVA, P. et al. A folded and functional synthetic PA1b: an interlocked entomotoxic miniprotein. **Biopolymers**, v. 92, n. 5, p. 436-44, 2009. ISSN 0006-3525 (Print)

0006-3525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19399851> >.

DA SILVA, P. H. et al. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693-709, Dec 1 2004. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15500846](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15500846) >.

DA SILVEIRA, R. B. et al. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, v. 49, n. 6, p. 758-68, May 2007. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17210169](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17210169) >.

DA SILVEIRA, R. B. et al. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 815-22, Jun 2002. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12175619](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12175619) >.

DA SILVEIRA, R. B. et al. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. **Biochimie**, v. 88, n. 9, p. 1241-53, Sep 2006. ISSN 0300-9084 (Print)

0300-9084 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16581177](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16581177) >.



DA SILVEIRA, R. B. et al. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. **Biochimie**, v. 89, n. 3, p. 289-300, Mar 2007. ISSN 0300-9084 (Print)

0300-9084 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17296256](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17296256) >.

DA SILVEIRA, R. B. et al. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Biochem J**, v. 406, n. 2, p. 355-63, Sep 1 2007. ISSN 1470-8728 (Electronic)

0264-6021 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17535156](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17535156) >.

DALY, N. L.; CRAIK, D. J. Bioactive cystine knot proteins. **Curr Opin Chem Biol**, v. 15, n. 3, p. 362-8, Jun 2011. ISSN 1879-0402 (Electronic)

1367-5931 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21362584](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21362584) >.

DE CASTRO, C. S. et al. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 273-80, Sep 1 2004. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15302533](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15302533) >.

DE CASTRO, C. S. et al. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 273-280, 2004. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010104002351> >.

DENG, M. et al. Synthesis and biological characterization of synthetic analogs of Huwentoxin-IV (Mutheraphotoxin-Hh2a), a neuronal tetrodotoxin-sensitive sodium channel inhibitor. **Toxicon**, v. 71, p. 57-65, Sep 2013. ISSN 1879-3150 (Electronic)

0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23726857> >.

DIB-HAJJ, S. D. et al. The Na(V)1.7 sodium channel: from molecule to man. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 1, p. 49-62, Jan 2013. ISSN 1471-003x.

DIONISIO, G. et al. Glycosylations and truncations of functional cereal phytases expressed and secreted by *Pichia pastoris* documented by mass spectrometry. **Protein Expression and Purification**,

v. 82, n. 1, p. 179-185, 3// 2012. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592811003494> >.

DONG, K. Insect sodium channels and insecticide resistance. **Invertebrate Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 17-30, 2007. ISSN 1354-2516. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10158-006-0036-9> >.

DUGGAN, P. J.; TUCK, K. L. Bioactive Mimetics of Conotoxins and other Venom Peptides. **Toxins**, v. 7, n. 10, p. 4175-4198, 10/16

09/02/received

10/08/accepted 2015. ISSN 2072-6651. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4626728/> >.

ELLIS, S. B. et al. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Mol Cell Biol**, v. 5, n. 5, p. 1111-21, May 1985. ISSN 0270-7306 (Print)

0270-7306.

ESCOUBAS, P.; DIOCHOT, S.; CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 893-907, 2000. ISSN 0300-9084. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908400011664> >.

ESCOUBAS, P.; PALMA, M. F.; NAKAJIMA, T. A microinjection technique using *Drosophila melanogaster* for bioassay-guided isolation of neurotoxins in arthropod venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 12, p. 1549-1555, 1995. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0041010195001077> >.

FABRICK, J. A. et al. Multi-Toxin Resistance Enables Pink Bollworm Survival on Pyramided Bt Cotton. **Sci Rep**, v. 5, p. 16554, 2015. ISSN 2045-2322.

FEITOSA, L. et al. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 1039-51, Jul 1998. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9690796](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9690796) >.

FERNANDES-PEDROSA MDE, F. et al. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, v. 9, p. 279, 2008. ISSN 1471-2164 (Electronic)

1471-2164 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18547439](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18547439) >.

FERRER, V. P. et al. A Novel Hyaluronidase from Brown Spider (*Loxosceles intermedia*) Venom (Dietrich's Hyaluronidase): From Cloning to Functional Characterization. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, USA, v. 7, n. 5, p. e2206, 05/02

10/16/received

03/25/accepted 2013. ISSN 1935-2727

1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3642055/> >.

FITCHES, E. C. et al. Fusion to Snowdrop Lectin Magnifies the Oral Activity of Insecticidal  $\alpha$ -Hexatoxin-Hv1a Peptide by Enabling its Delivery to the Central Nervous System. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39389, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0039389> >.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **Am J Med Sci**, v. 304, n. 4, p. 261-7, Oct 1992. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1415323](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1415323) >.

GAO, B. et al. Expression, renaturation and biological activity of recombinant conotoxin GeXIVAWT. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-8, 2012. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4287-6> >.

GELLY, J. C. et al. The KNOTTIN website and database: a new information system dedicated to the knottin scaffold. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. suppl 1, p. D156-D159, January 1, 2004 2004. Disponível em: < [http://nar.oxfordjournals.org/content/32/suppl\\_1/D156.abstract](http://nar.oxfordjournals.org/content/32/suppl_1/D156.abstract) >.

GERTSCH, W. J.; RUSSELL, F. E. *Loxosceles deserta* Gertsch. **Toxicon**, v. 13, n. 3, p. 203-4, Jun 1975. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1145644](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1145644) >.

GRACY, J. R. M. et al. KNOTTIN: the knottin or inhibitor cystine knot scaffold in 2007. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. suppl 1, p. D314-D319, January 1, 2008 2008. Disponível em: < [http://nar.oxfordjournals.org/content/36/suppl\\_1/D314.abstract](http://nar.oxfordjournals.org/content/36/suppl_1/D314.abstract) >.

GREMSKI, L. H. et al. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Mol Biosyst**, v. 6, n. 12, p. 2403-16, Dec 2010. ISSN 1742-2051 (Electronic)

1742-2051 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20644878](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20644878) >.

GREMSKI, L. H. et al. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**, v. 83, p. 91-120, 6/1/ 2014. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010114000750> >.

GUERRERO, F.; CIRAGAN, A.; IWAĪ, H. Tandem SUMO fusion vectors for improving soluble protein expression and purification. **Protein Expression and Purification**, v. 116, p. 42-49, 12// 2015. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592815300395> >.

GUNTERT, P. Automated NMR structure calculation with CYANA. **Methods Mol Biol**, v. 278, p. 353-78, 2004. ISSN 1064-3745 (Print)

1064-3745.

HARLOW, E.; LANE, D. Immunoblotting. **Antibodies: a laboratory manual**, p. 471-510, 1988a.

\_\_\_\_\_. Using antibodies: A laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1988b.

HEITZ, A. et al. Knottin cyclization: impact on structure and dynamics. **BMC Struct Biol**, v. 8, p. 54, 2008. ISSN 1472-6807 (Electronic)

1472-6807 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19077275](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19077275) >.

HERZIG, V.; HODGSON, W. C. Neurotoxic and insecticidal properties of venom from the Australian theraphosid spider *Selenotholus foelschei*. **NeuroToxicology**, v. 29, n. 3, p. 471-475, 5// 2008. ISSN 0161-813X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161813X08000429> >.

HERZIG, V.; KING, G. F. The Cystine Knot Is Responsible for the Exceptional Stability of the Insecticidal Spider Toxin omega-Hexatoxin-Hv1a. **Toxins (Basel)**, v. 7, n. 10, p. 4366-80, 2015. ISSN 2072-6651.

HERZIG, V. et al. ArachnoServer 2.0, an updated online resource for spider toxin sequences and structures. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl 1, p. D653-D657, January 1, 2011 2011. Disponível em: < [http://nar.oxfordjournals.org/content/39/suppl\\_1/D653.abstract](http://nar.oxfordjournals.org/content/39/suppl_1/D653.abstract) >.

HESKETH, A. R. et al. Investigating the physiological response of *Pichia (Komagataella) pastoris* GS115 to the heterologous expression of misfolded proteins using chemostat cultures. **Appl Microbiol Biotechnol**, Sep 11 2013. ISSN 0175-7598.

HU, H. et al. Codon Optimization Significantly Improves the Expression Level of a Keratinase Gene in *Pichia pastoris*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e58393, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058393> >.

HUANG, P. et al. The Activation Effect of Hainantoxin-I, a Peptide Toxin from the Chinese Spider, *Ornithoctonus hainana*, on Intermediate-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels. **toxins**, v. 6, n. 8, p. 2568-2579, 2014. ISSN 2072-6651. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2072-6651/6/8/2568> >.

HUGHES, S. R. et al. Lycotoxin-1 insecticidal peptide optimized by amino acid scanning mutagenesis and expressed as a coproduct in an ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Journal of Peptide Science**, v. 14, n. 9, p. 1039-1050, 2008. ISSN 1099-1387. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/psc.1040> >.

Ji, W. et al. Expression and purification of Huwentoxin-I in baculovirus system. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 2, p. 454-458, 2005. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592805000689> >.

KAPUST, R. B. et al. The P1' specificity of tobacco etch virus protease. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 294, n. 5, p. 949-55, Jun 28 2002. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12074568> >.

KHAN, M. A. et al. Studies to analyse the relationship between IFN $\alpha$ 2b gene dosage and its expression, using a *Pichia pastoris*-based expression system. **Yeast**, v. 31, n. 1, p. 13-28, 2013. ISSN 1097-0061. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/yea.2990> >.

KHOO, K. K. et al. Distinct Disulfide Isomers of  $\frac{1}{4}$ -Conotoxins KIIIA and KIIIB Block Voltage-Gated Sodium Channels. **Biochemistry**, v. 51, n. 49, p. 9826-9835, 2013/11/21 2012. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/bi301256s> >.

KIM, S.-Y., JUNG-HOON SOHN, YU-RYANG PYUN, EUI-SUNG CHOI. Variations in Protein Glycosylation in *Hansenula polymorpha* Depending on Cell Culture Stage. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 17, n. (12), p. 1949~1954, 2007.

KIMURA, R. H. et al. Engineered knottin peptides: a new class of agents for imaging integrin expression in living subjects. **Cancer Res**, v. 69, n. 6, p. 2435-42, Mar 15 2009. ISSN 1538-7445 (Electronic)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19276378](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19276378) >.

KING, G. F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 11, n. 11, p. 1469-1484, 2011. Disponível em: < <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1517/14712598.2011.621940> >.

KING, G. F.; ESCOUBAS, P.; NICHOLSON, G. M. Peptide toxins that selectively target insect Na(V) and Ca(V) channels. **Channels (Austin)**, v. 2, n. 2, p. 100-16, Mar-Apr 2008. ISSN 1933-6950.

KING, G. F. et al. A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. **Toxicon**, v. 52, n. 2, p. 264-76, Aug 1 2008. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101.

KING, G. F.; TEDFORD, H. W.; MAGGIO, F. STRUCTURE AND FUNCTION OF INSECTICIDAL NEUROTOXINS FROM AUSTRALIAN FUNNEL-WEB SPIDERS. **Toxin Reviews**, v. 21, n. 4, p. 361-389, 2002. Disponível em: < <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1081/TXR-120014409> >.

KING, G. F.; VETTER, I. No Gain, No Pain: Nav1.7 as an Analgesic Target. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 9, p. 749-751, 2014/09/17 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/cn500171p> >.

KLINT, J. K. et al. Isolation, synthesis and characterization of  $\omega$ -TRTX-Cc1a, a novel tarantula venom peptide that selectively targets L-type CaV channels. **Biochemical Pharmacology**, v. 89, n. 2, p. 276-286, 5/15/ 2014. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295214001026> >.

KLINT, J. K. et al. Production of Recombinant Disulfide-Rich Venom Peptides for Structural and Functional Analysis via Expression in the Periplasm of *E. coli*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63865, 2013. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0063865> >.

KLINT, J. K. et al. Seven novel modulators of the analgesic target Nav1.7 uncovered using a high-throughput venom-based discovery approach. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 10, p. 2445-2458, 2015. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13081> >.

KRETLER, C.; REINHART, C.; BEVANS, C. G. Expression of GPCRs in *Pichia pastoris* for structural studies. **Methods Enzymol**, v. 520, p. 1-29, 2013. ISSN 1557-7988 (Electronic)

0076-6879 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=23332693](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23332693) >.

KUKK, K.; KASVANDIK, S.; SAMEL, N. N-glycosylation site occupancy in human prostaglandin H synthases expressed in *Pichia pastoris*. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 436, 2014. ISSN 2193-1801. Disponível em: < <http://www.springerplus.com/content/3/1/436> >.

KUSMA, J. et al. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**, v. 90, n. 11-12, p. 1722-36, Nov-Dec 2008. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18760322](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18760322) >.

KWAN, A. H. et al. Macromolecular NMR spectroscopy for the non-spectroscopist. **FEBS J**, v. 278, n. 5, p. 687-703, Mar 2011. ISSN 1742-4658 (Electronic)

1742-464X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21214860> >.

LEWIS, A. H.; RAMAN, I. M. Interactions among DIV voltage-sensor movement, fast inactivation, and resurgent Na current induced by the NaV $\beta$ 24 open-channel blocking peptide. **The Journal of General Physiology**, v. 142, n. 3, p. 191-206, September 1, 2013. Disponível em: < <http://jgp.rupress.org/content/142/3/191.abstract> >.

LI, D. et al. Function and solution structure of hainantoxin-I, a novel insect sodium channel inhibitor from the Chinese bird spider *Selenocosmia hainana*. **FEBS Letters**, v. 555, n. 3, p. 616-622, 2003. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579303013036> >.

LI, Y. Production of human antimicrobial peptide LL-37 in *Escherichia coli* using a thioredoxin-SUMO dual fusion system. **Protein Expression and Purification**, v. 87, n. 2, p. 72-78, 2013. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592812002951> >.

LIN, Y.-J.; CHU, L.-K.; HORNG, J.-C. Effects of the Terminal Aromatic Residues on Polyproline Conformation: Thermodynamic and Kinetic Studies. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 52, p. 15796-15806, 2015/12/31. ISSN 1520-6106. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b08717> >.

LIN, Y. et al. Expression and functional characterization of chitribrisin, a thrombin-like enzyme, in the venom of the Chinese green pit viper (*Trimeresurus albolabris*). **Protein Expression and Purification**, v. 67, n. 1, p. 48-52, 2009. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592809000746> >.

LIU, Y. et al. A positively charged surface patch is important for hainantoxin-IV binding to voltage-gated sodium channels. **Journal of Peptide Science**, v. 18, n. 10, p. 643-649, 2012. ISSN 1099-1387. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/psc.2451> >.

LU, S. L. S., GU X. Three-dimensional structure of *Selenocosmia huwena* lectin-I (SHL-I) from the venom of the spider *Selenocosmia huwena* by 2D-NMR. **L Protein Chem**, v. 18, n. 5, p. 609-617, 1999.

LUO, J. et al. Molecular Surface of JZTX-V ( $\beta$ -Theraphotoxin-Cj2a) Interacting with Voltage-Gated Sodium Channel Subtype NaV1.4. **toxins**, v. 6, n. 7, p. 2177-2193, 2014. ISSN 2072-6651. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2072-6651/6/7/2177> >.

MALAUQUE, C. Aspectos clínicos e epidemiológicos do loxoscelismo em São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, p. 139-143, 2002.

MALAUQUE, C. M. S. et al. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon**, v. 58, n. 8, p. 664-671, 2011. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101011100287X> >.

MANZOLI-PALMA, M. F.; GOBBI, N.; PALMA, M. S. Insects as biological models to assay spider and scorpion venom toxicity. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 9, p. 174-185, 2003. ISSN 1678-9199. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1678-91992003000200004&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992003000200004&nrm=iso) >.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M. L. [*Loxosceles Heinecken & Lowe*, 1835 (Araneae; Sicariidae) species distribution in the State of Parana]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, n. 4, p. 331-5, Jul-Aug 2005. ISSN 0037-8682 (Print)

0037-8682 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16082481](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16082481) >.

MARX, H. et al. Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 8, p. 1260-1270, 2009. ISSN 1567-1364. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00561.x> >.

MATSUBARA, F. H. et al. A novel ICK peptide from the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland: Cloning, heterologous expression and immunological cross-reactivity approaches. **Toxicon**, v. 71, n. 0, p. 147-158, 2013. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010113001955> >.

MCDONALD, N. Q.; HENDRICKSON, W. A. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. **Cell**, v. 73, n. 3, p. 421-424, 1993. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009286749390127C> >.

MEISSNER, G. O. **CLONAGEM E EXPRESSÃO DE TOXINA PERTENCENTE À FAMÍLIA DAS NOTINAS PRESENTE NO VENENO DE ARANHA-MARROM (*Loxosceles intermedia*)**

2012. 75 (Mestre). Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MIDDLETON, R. E. et al. Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels. **Biochemistry**, v. 41, n. 50, p. 14734-14747, 2002. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037126684&partnerID=40&md5=29005d5fa3d2affe7f6d7ec1972a8314> >.

MIRANDA, D. M. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors block tyrotoxin-induced calcium influx in synaptosomes. **Neuroreport**, v. 9, n. 7, p. 1371-3, May 11 1998. ISSN 0959-4965 (Print)

0959-4965.

MOBLI, M.; KING, G. F. NMR methods for determining disulfide-bond connectivities. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 849-54, Nov 2010. ISSN 1879-3150 (Electronic)

0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20603141> >.



MOBLI, M. et al. An automated tool for maximum entropy reconstruction of biomolecular NMR spectra. **Nat Methods**, v. 4, n. 6, p. 467-8, Jun 2007. ISSN 1548-7091 (Print)

1548-7091.

MOLLICA, A. et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Two Opioid Agonist and Cav2.2 Blocker Multitarget Ligands. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 86, n. 2, p. 156-162, 2015. ISSN 1747-0285. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.12479> >.

MOTA, I.; BARBARO, K. C. Biological and biochemical properties of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. **Toxin Reviews**, v. 14, n. 3, p. 401-421, 1995.

MOTIN, L.; DUREK, T.; ADAMS, D. J. Modulation of human Na<sub>v</sub>1.7 channel gating by synthetic alpha-scorpion toxin OD1 and its analogs. **Channels (Austin)**, p. 1-9, Dec 8 2015. ISSN 1933-6950.

NAKASU, E. Y. et al. Novel biopesticide based on a spider venom peptide shows no adverse effects on honeybees. **Proc Biol Sci**, v. 281, n. 1787, Jul 22 2014. ISSN 0962-8452.

NEWCOMB, R. et al. SNX-325, a novel calcium antagonist from the spider *Segestria florentina*. **Biochemistry**, v. 34, n. 26, p. 8341-7, Jul 4 1995. ISSN 0006-2960 (Print)

0006-2960.

NOSEDA, D. G. et al. Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia* (*Komagataella*) *pastoris* under AOX1 promoter. **Protein Expression and Purification**, v. 92, n. 2, p. 235-244, 2013. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104659281300168X> >.

OGIYAMA, T. et al. Discovery of a 1-isopropyltetrahydroisoquinoline derivative as an orally active N-type calcium channel blocker for neuropathic pain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 15, p. 4624-4637, 8/1/ 2015. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089615004307> >.

OHKUBO, T.; YAMAZAKI, J.; KITAMURA, K. Tarantula toxin ProTx-I differentiates between human T-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels Cav3.1 and Cav3.2. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 112, n. 4, p. 452-458, 2010. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77951242465&partnerID=40&md5=770f841e9caeab609700ac8e86d30aa9> >.

PALAGI, A. et al. Unravelling the complex venom landscapes of lethal Australian funnel-web spiders (*Hexathelidae*: *Atracinae*) using LC-MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Proteomics**, v. 80, p. 292-310, 3/27/ 2013. ISSN 1874-3919. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391913000195> >.

PARADIS-BAS, M.; TULLA-PUCHE, J.; ALBERICIO, F. The road to the synthesis of "difficult peptides". **Chem Soc Rev**, Nov 27 2015. ISSN 0306-0012.

PEARSON, J. D.; MCCROSKEY, M. C. Perfluorinated acid alternatives to trifluoroacetic acid for reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr A**, v. 746, n. 2, p. 277-81, Oct 11 1996. ISSN 0021-9673 (Print)

0021-9673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8916558> >.

PEDRO, A. Q. et al. Evaluation of Mut(S) and Mut(+) *Pichia pastoris* strains for membrane-bound catechol-O-methyltransferase biosynthesis. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 175, n. 8, p. 3840-55, Apr 2015. ISSN 0273-2289.

PELZ, B. J.; BRYCE, P. J. Pathophysiology of Food Allergy. **Pediatr Clin North Am**, v. 62, n. 6, p. 1363-75, Dec 2015. ISSN 0031-3955.

PERETZ, A. et al. Targeting the voltage sensor of Kv7.2 voltage-gated K<sup>+</sup> channels with a new gating-modifier. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 35, p. 15637-15642, August 31, 2010. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/107/35/15637.abstract> >.

PIETROBON, D. Calcium channels and migraine. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1828, n. 7, p. 1655-1665, 2013. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84876930471&partnerID=40&md5=692b4fa8888ffebeeec86e9c9b68a298> >.

PLATNICK, N. I. The World Spider Catalog, Version 17.0. **American Museum of Natural History**, 2016. Disponível em: < <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/SICARIIIDAE.html> >.

PRICE-CARTER, M.; GRAY, W. R.; GOLDENBERG, D. P. Folding of  $\alpha$ -Conotoxins. 1. Efficient Disulfide-Coupled Folding of Mature Sequences in Vitro. **Biochemistry**, v. 35, n. 48, p. 15537-15546, 2012/11/06 1996. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/bi961574c> >.

PYATI, P.; FITCHES, E.; GATEHOUSE, J. A. Optimising expression of the recombinant fusion protein biopesticide omega-hexatoxin-Hv1a/GNA in *Pichia pastoris*: sequence modifications and a simple method for the generation of multi-copy strains. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 41, n. 8, p. 1237-47, Aug 2014. ISSN 1367-5435.

QIAEXPRESSIONIST, Ed. **A handbook for a high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins**. 2003.

RAHMAN, W.; PATEL, R.; DICKENSON, A. H. Electrophysiological evidence for voltage-gated calcium channel 2 (Cav2) modulation of mechano- and thermosensitive spinal neuronal responses in a rat model of osteoarthritis. **Neuroscience**, v. 305, p. 76-85, Oct 1 2015. ISSN 0306-4522.

RAIBAUT, L.; EL MAHDI, O.; MELNYK, O. Solid phase protein chemical synthesis. **Top Curr Chem**, v. 363, p. 103-54, 2015. ISSN 0340-1022 (Print)

0340-1022.

RAO, S. et al. Soluble expression and purification of the recombinant bioactive peptide precursor BPP-1 in *Escherichia coli* using a cELP-SUMO dual fusion system. **Protein Expr Purif**, v. 118, p. 113-9, Feb 2016. ISSN 1046-5928.

RASH, L. D.; HODGSON, W. C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon**, v. 40, n. 3, p. 225-254, 2002. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010101001994> >.

REDAELLI, E. et al. Target promiscuity and heterogeneous effects of tarantula venom peptides affecting Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> ion channels. **J Biol Chem**, v. 285, n. 6, p. 4130-42, Feb 5 2010. ISSN 0021-9258.

RODRIGUEZ, A. et al. Intraspecific variations in *Conus purpurascens* injected venom using LC/MALDI-TOF-MS and LC-ESI-TripleTOF-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 20, p. 6105-6116, 2015/08/01 2015. ISSN 1618-2642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-015-8787-y> >.

RONG, M. et al. Molecular basis of the tarantula toxin jingzhaotoxin-III ( $\hat{I}^2$ -TRTX-Cj1 $\hat{I}\pm$ ) interacting with voltage sensors in sodium channel subtype Nav1.5. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 9, p. 3177-3185, September 1, 2011 2011. Disponível em: < <http://www.fasebj.org/content/25/9/3177.abstract> >.

ROSENGREN, K. J. et al. Solution Structures of the cis- and trans-Pro30 Isomers of a Novel 38-Residue Toxin from the Venom of *Hadronyche infensa* sp. that Contains a Cystine-Knot Motif within Its Four Disulfide Bonds†,‡. **Biochemistry**, v. 41, n. 10, p. 3294-3301, 2002/03/01 2002. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/bi011932y> >.

SADE, Y. B. et al. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 1, p. 170-177, 1// 2012. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135727251100286X> >.

SAMBROOK, J. **Molecular cloning : a laboratory manual**. 2001.

SANTOS-FILHO, N. A. et al. Heterologous expression and biochemical and functional characterization of a recombinant alpha-type myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* snake. **Biochimie**, v. 105, p. 119-28, Oct 2014. ISSN 0300-9084.

SATAKARNI, M.; CURTIS, R. Production of recombinant peptides as fusions with SUMO. **Protein Expression and Purification**, v. 78, n. 2, p. 113-119, 2011. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592811001070> >.

SEZERINO, U. M. et al. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 92, n. 5, p. 546-8, Sep-Oct 1998. ISSN 0035-9203 (Print)

0035-9203 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9861376](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9861376) >.

SHEETS, M. F.; FOZZARD, H. A.; HANCK, D. A. Important Role of Asparagines in Coupling the Pore and Voltage-Sensor Domain in Voltage-Gated Sodium Channels. **Biophys J**, v. 109, n. 11, p. 2277-86, Dec 1 2015. ISSN 0006-3495.

SHEN, Y. et al. TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. **J Biomol NMR**, v. 44, n. 4, p. 213-23, Aug 2009. ISSN 0925-2738.

SILVA, A. O. et al. Inhibitory effect of the recombinant *Phoneutria nigriventer* Tx1 toxin on voltage-gated sodium channels. **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2756-2763, 2012. ISSN 0300-9084. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908412003409> >.

SMITH, J. J. et al. Unique scorpion toxin with a putative ancestral fold provides insight into evolution of the inhibitor cystine knot motif. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 26, p. 10478-10483, June 28, 2011. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/108/26/10478.abstract> >.

SONODA, H. et al. Functional expression of single-chain Fv antibody in the cytoplasm of *Escherichia coli* by thioredoxin fusion and co-expression of molecular chaperones. **Protein Expression and Purification**, v. 70, n. 2, p. 248-253, 4// 2010. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592809002939> >.

SOUZA, I. A. et al. Expression of a recombinant *Phoneutria* toxin active in calcium channels. **Toxicon**, v. 60, n. 5, p. 907-18, Oct 2012a. ISSN 1879-3150 (Electronic)

0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22659539> >.

SOUZA, I. A. et al. Expression of a recombinant *Phoneutria* toxin active in calcium channels. **Toxicon**, v. 60, n. 5, p. 907-918, 2012b. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010112005028> >.

TAMBOURGI, D. V.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; VAN DEN BERG, C. W. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1113-1119, 2010. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010110000371> >.

TAMBOURGI, D. V. et al. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 251, n. 1, p. 366-73, Oct 9 1998. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9790962](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9790962) >.

TAWDE, M. D.; FREIMUTH, P. Toxic misfolding of Arabidopsis cellulases in the secretory pathway of *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 85, n. 2, p. 211-217, 2012. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592812002185> >.

TAWDE, M. D.; FREIMUTH, P. Toxic misfolding of Arabidopsis cellulases in the secretory pathway of *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, v. 85, n. 2, p. 211-7, Oct 2012. ISSN 1046-5928.

TAY, W. T. et al. Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry2Ab Is Conferred by Mutations in an ABC Transporter Subfamily A Protein. **PLoS Genet**, v. 11, n. 11, p. e1005534, Nov 2015. ISSN 1553-7390.

TILEVA, M. et al. Production of aggregation prone human interferon gamma and its mutant in highly soluble and biologically active form by SUMO fusion technology. **Protein Expression and Purification**, v. 117, p. 26-34, 1// 2016. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592815300723> >.

TOUCHARD, A. et al. The complexity and structural diversity of ant venom peptidomes is revealed by mass spectrometry profiling. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 29, n. 5, p. 385-396, 2015. ISSN 1097-0231. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.7116> >.

TREVISAN-SILVA, D. et al. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). **Biochimie**, v. 92, n. 1, p. 21-32, 2010. ISSN 0300-9084. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908409002764> >.

TSCHOPP, J. F. et al. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. **Nucleic Acids Res**, v. 15, n. 9, p. 3859-76, May 11 1987. ISSN 0305-1048 (Print) 0305-1048.

TU, W. et al. Improved production of holotoxin Stx2 with biological activities by using a single-promoter vector and an auto-induction expression system. **Protein Expression and Purification**, v. 67, n. 2, p. 169-174, 2009. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592809001181> >.

TU, Y. Y. W., GANG WANG, JIANAN WU, YONGGANG LIU, SHUIJIE WANG, CHENGGANG JIANG, XUEHUI CAI. High-level expression and immunogenicity of a porcine circovirus type 2 capsid protein through codon optimization in *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 7, p. 2867-2875, 2013.

VASSILEVSKI, A. A.; KOZLOV, S. A.; GRISHIN, E. V. Molecular diversity of spider venom. **Biochemistry (Mosc)**, v. 74, n. 13, p. 1505-34, Dec 2009. ISSN 1608-3040 (Electronic)

0006-2979 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20210706> >.

VEIGA, S. S. et al. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 38, n. 6, p. 825-39, Jun 2000. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10695968](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10695968) >.

VEIGA, S. S. et al. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. **Histochem J**, v. 32, n. 7, p. 397-408, Jul 2000. ISSN 0018-2214 (Print)

0018-2214 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10987503](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10987503) >.

VEIGA, S. S. et al. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 7, p. 843-50, Jul 2001. ISSN 0100-879X (Print)

0100-879X (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11449301](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11449301) >.

VEIGA, S. S. et al. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. **Thromb Res**, v. 102, n. 3, p. 229-37, May 1 2001. ISSN 0049-3848 (Print)

0049-3848 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11369416](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11369416) >.

VETTER, I. et al. Isolation, characterization and total regioselective synthesis of the novel  $\hat{1}\frac{1}{4}$ O-conotoxin MfVIA from *Conus magnificus* that targets voltage-gated sodium channels. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 4, p. 540-548, 2012. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295212003516> >.

VETTER, R. S. Seasonality of brown recluse spiders, *Loxosceles reclusa*, submitted by the general public: Implications for physicians regarding loxoscelism diagnoses. **Toxicon**, v. 58, n. 8, p. 623-625, 2011. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010111002856> >.

VIEIRA, L. B. et al. PnTx3-6 a spider neurotoxin inhibits K<sup>+</sup>-evoked increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release in synaptosomes. **Neurochem Int**, v. 42, n. 4, p. 277-82, Mar 2003. ISSN 0197-0186 (Print)

0197-0186.

VINK, S.; ALEWOOD, P. F. Targeting voltage-gated calcium channels: developments in peptide and small-molecule inhibitors for the treatment of neuropathic pain. **British Journal of Pharmacology**, v. 167, n. 5, p. 970-989, 2012. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02082.x> >.

VRANKEN, W. F. et al. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. **Proteins**, v. 59, n. 4, p. 687-96, Jun 1 2005. ISSN 0887-3585.

WANG, J. M. et al. Molecular Surface of Tarantula Toxins Interacting with Voltage Sensors in K(v) Channels. **The Journal of General Physiology**, v. 123, n. 4, p. 455-467, 12/29/received

03/03/accepted 2004. ISSN 0022-1295

1540-7748. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2217462/> >.

WANG, Q. H. et al. [The expression of BmK AngM1 in Mut(s) and Mut(+) recombinants of *Pichia pastoris*]. **Yao Xue Xue Bao**, v. 50, n. 7, p. 910-5, Jul 2015. ISSN 0513-4870 (Print)

0513-4870.

WANG, X.-H. et al. Discovery and characterization of a family of insecticidal neurotoxins with a rare vicinal disulfide bridge. **Nat Struct Mol Biol**, v. 7, n. 6, p. 505-513, 2000. ISSN 1072-8368.

WERLE, M. et al. Evaluation and improvement of the properties of the novel cystine-knot microprotein McoEeTI for oral administration. **Int J Pharm**, v. 332, n. 1-2, p. 72-9, Mar 6 2007. ISSN 0378-5173 (Print)

0378-5173 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17070661](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17070661) >.

WERLE, M. et al. Characterisation of the barrier caused by lumenally secreted gastro-intestinal proteolytic enzymes for two novel cystine-knot microproteins. **Amino Acids**, v. 35, n. 1, p. 195-200, Jun 2008. ISSN 1438-2199 (Electronic)

0939-4451 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17619117](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17619117) >.

WERLE, M. et al. The potential of cystine-knot microproteins as novel pharmacophoric scaffolds in oral peptide drug delivery. **J Drug Target**, v. 14, n. 3, p. 137-46, Apr 2006. ISSN 1061-186X (Print)

1026-7158 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16753827](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16753827) >.

WINDLEY, M. J. et al. Spider-venom peptides as bioinsecticides. **Toxins (Basel)**, v. 4, n. 3, p. 191-227, Mar 2012. ISSN 2072-6651.

WU, J.-M.; WANG, S.-Y.; FU, W.-C. Lower Temperature Cultures Enlarge the Effects of Vitreoscilla Hemoglobin Expression on Recombinant *Pichia pastoris*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 10, p. 13212-13226, 2012. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/10/13212> >.

XIAO, Y.; LIANG, S. Inhibition of neuronal tetrodotoxin-sensitive Na<sup>+</sup> channels by two spider toxins: hainantoxin-III and hainantoxin-IV. **Eur J Pharmacol**, v. 477, n. 1, p. 1-7, Sep 5 2003. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999.

XIE, C. et al. Kv1.3 potassium channel-blocking toxin Ctri9577, novel gating modifier of Kv4.3 potassium channel from the scorpion toxin family. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 444, n. 3, p. 406-410, 2014. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X14001181> >.

YANG, S. et al. Effect of insecticidal fusion proteins containing spider toxins targeting sodium and calcium ion channels on pyrethroid-resistant strains of peach-potato aphid (*Myzus persicae*). **Pest Manag Sci**, v. 71, n. 7, p. 951-6, Jul 2015. ISSN 1526-498x.

YANG, S. et al. A recombinant fusion protein containing a spider toxin specific for the insect voltage-gated sodium ion channel shows oral toxicity towards insects of different orders. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 47, n. 0, p. 1-11, 2014. ISSN 0965-1748. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174814000150> >.

YANG, Y. L. et al. Expression, purification and characterization of low-glycosylation influenza neuraminidase in alpha-1,6-mannosyltransferase defective *Pichia pastoris*. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 2, p. 857-64, Feb 2012. ISSN 0301-4851.

YING, J.; ROCHE, J.; BAX, A. Homonuclear decoupling for enhancing resolution and sensitivity in NOE and RDC measurements of peptides and proteins. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 241, p. 97-102, 4// 2014. ISSN 1090-7807. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090780713002899> >.

YOUNG, A. R.; PINCUS, S. J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon**, v. 39, n. 2-3, p. 391-400, Feb-Mar 2001. ISSN 0041-0101 (Print)

0041-0101 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10978759](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10978759) >.



ZAMPONI, G. W. et al. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. **Pharmacol Rev**, v. 67, n. 4, p. 821-70, Oct 2015. ISSN 0031-6997.

ZANETTI, V. C. et al. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 13, n. 2, p. 135-48, Mar 2002. ISSN 0957-5235 (Print)

0957-5235 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11914656](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11914656) >.

ZEPEDA, A. B. et al. HSF-1, HIF-1 and HSP90 expression on recombinant *Pichia pastoris* under fed-batch fermentation. **Braz J Microbiol**, v. 45, n. 2, p. 485-90, 2014. ISSN 1678-4405 (Electronic)

1517-8382 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=25242931](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=25242931) >.

ZHAN, R. et al. High-level extracellular expression of inulin fructotransferase in *Pichia pastoris* for DFA III production. **J Sci Food Agric**, Sep 26 2014. ISSN 1097-0010 (Electronic)

0022-5142 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=25257988](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=25257988) >.

ZHANG, F. et al. A survey of the venom of the spider *Lycosa vittata* by biochemical, pharmacological and transcriptomic analyses. **Toxicon**, May 8 2015. ISSN 1879-3150 (Electronic)

0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25963839> >.

ZHU, S. et al. Evolutionary origin of inhibitor cystine knot peptides. **The FASEB Journal**, July 3, 2003 2003. Disponível em: < <http://www.fasebj.org/content/early/2003/09/05/fj.02-1044fje.short> >.

ZOBEL-THROPP, P. A.; KERINS, A. E.; BINFORD, G. J. Sphingomyelinase D in sicariid spider venom is a potent insecticidal toxin. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 265-71, Sep 1 2012. ISSN 0041-0101.

## 8 Artigos

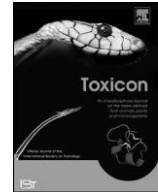
Toxicon 71 (2013) 147–158



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)



A novel ICK peptide from the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland: Cloning, heterologous expression and immunological cross-reactivity approaches



**Fernando Hitomi Matsubara<sup>a</sup>, Luiza Helena Gremski<sup>a</sup>,  
Gabriel Otto Meissner<sup>a</sup>, Eduardo Soares Constantino  
Lopes<sup>a</sup>, Waldemiro Gremski<sup>a,b</sup>, Andrea Senff-Ribeiro<sup>a</sup>,  
Olga Meiri Chaim<sup>a</sup>, Silvio Sanches Veiga<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Jardim das Américas, 81531-990 Curitiba, Paraná, Brazil <sup>b</sup> Catholic University of Paraná, Health and Biological Sciences Institute, Curitiba, Paraná, Brazil



Contents lists available at [scienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)



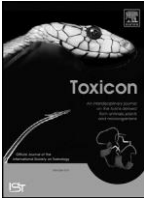
Review

## Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins



Luiza Helena Gremski <sup>a,b</sup>, Dilza Trevisan-Silva <sup>a</sup>, Valéria Pereira Ferrer <sup>a</sup>, Fernando Hitomi Matsubara <sup>a</sup>, Gabriel Otto Meissner <sup>a</sup>,  
Ana Carolina Martins Wille <sup>a,c</sup>, Larissa Vuitika <sup>a</sup>, Camila Dias-Lopes <sup>d</sup>,  
Anwar Ullah <sup>e</sup>, Fábio Rogério de Moraes <sup>e</sup>, Carlos Chávez-Olórtegui <sup>d</sup>,  
Katia Cristina Barbaro <sup>f</sup>, Mario Tyago Murakami <sup>g</sup>,  
Raghuvir Krishnaswamy Arni <sup>e</sup>, Andrea Senff-Ribeiro <sup>a</sup>, Olga Meiri Chaim <sup>a</sup>, Silvio Sanches Veiga <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil <sup>b</sup> Departamento de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Brazil <sup>c</sup> Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil <sup>d</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil <sup>e</sup> Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil <sup>f</sup> Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil  
Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo, Brazil



Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: Evaluation of biological conservation by immune cross-reactivity



**Daniela Regina Buch<sup>a</sup>, Fernanda Nunes Souza<sup>a</sup>, Gabriel Otto Meissner<sup>a</sup>, Adriano Marcelo Morgon<sup>a</sup>, Luiza Helena Gremski<sup>a, b</sup>, Valeria Pereira Ferrer<sup>a</sup>, Dilza Trevisan-Silva<sup>a</sup>, Fernando Hitomi Matsubara<sup>a</sup>, Mariana Boia-Ferreira<sup>a</sup>, Youssef Bacila Sade<sup>a</sup>, Daniele Chaves-Moreira<sup>a</sup>, Waldemiro Gremski<sup>a, c</sup>, Silvio Sanches Veiga<sup>a</sup>, Olga Meiri Chaim<sup>a</sup>, Andrea Senff-Ribeiro<sup>a, \*</sup>**

<sup>a</sup> Department of Cell Biology, Federal University of Parana, Curitiba, Parana, Brazil; <sup>b</sup> Department of Clinical Pathology, Clinical Hospital, Federal University of Parana, Curitiba, Parana, Brazil; <sup>c</sup> Catholic University of Parana, Health and Biological Sciences Institute, Curitiba, Parana, Brazil

