

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antônio Guilherme de Souza”
Instituto Butantan

Marcos Lorenzi Martins

**Clonagem e expressão de uma proteína rica em cisteína (CRISP) isolada
da glândula de veneno da centopeia *Cryptops iheringi***

São Paulo
2020

Marcos Lorenzi Martins

Clonagem e expressão de uma proteína rica em cisteína (CRISP) isolada da glândula de veneno da centopeia *Cryptops iheringi*

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Toxinas de Interesse em Saúde.

Orientador (a): Eliana Faquim de Lima Mauro

Coorientador (a): Geraldo Santana Magalhães

São Paulo

2020

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Martins, Marcos Lorenzi

Clonagem e expressão de uma proteína rica em cisteína (CRISP) isolada da glândula de veneno da centopeia *Cryptops iheringi*/ Marcos Lorenzi Martins; orientador Eliana Faquim de Lima Mauro. – São Paulo, 2020.

30 f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza” desenvolvido no Instituto Butantan para o Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde.

1. Chilopoda. 2. Envenenamento. 3. Clonagem. 4. Expressão. I. Martins, Marcos Lorenzi. II. Instituto Butantan. III. Curso de Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo aluno a partir do modelo desenvolvido pela
Biblioteca do Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Marcos Lorenzi Martins, aluno(a) do curso Toxinas de Interesse em Saúde, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

() Imediato

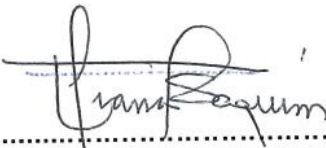
() 06 meses

() 12 meses

Outro prazo 12/2021 Justifique: Os dados aqui apresentados constituem parte de um projeto maior, no qual o grupo de pesquisadores em que estou inserido ainda está trabalhando para concluir, portanto a divulgação dos dados preliminares pode comprometer publicações futuras.

São Paulo, 28 de Fevereiro de 2020


.....
Aluno(a): Marcos Lorenzi Martins


.....
De acordo:
Orientador(a): Eliana Faquim de Lima Mauro

À minha família e principalmente minha irmã, pela força e luz que depositam em mim e dão forças para chegar a lugares nunca explorados.

À memória de Rosmari Lorenzi e Cristina Caporrino, fundamentais nos processos de conquista desta etapa tão importante para mim e as marcas que deixaram em minha vida.

À ciência brasileira, pelo bem da nação e do mundo.

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que passaram em minha vida acadêmica e tiveram algo a acrescentar.

Aos amigos, professores, mestre e doutores do Laboratório de Imunopatologia e a incrível experiência de convivência.

Aos doutores, Sarah, Geraldo, Eliana e Lhiri pela paciência e compreensão.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente estando ou não mais presentes.

Este trabalho foi desenvolvido dentro da infraestrutura do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan e bolsa de estudos concedida pelo Governo do estado de São Paulo, Secretaria da Saúde. O autor agradece o apoio financeiro e institucional conferido a este projeto.

“Aprende a semear a luz no solo dos corações, conduzindo o arado milagroso do amor, para que as sombras da ignorância abandonem a terra para sempre”.

Emmanuel – Francisco Candido Xavier

RESUMO

Martins, Marcos Lorenzi. Clonagem e expressão de uma proteína rica em cisteína (CRISP) isolada da glândula de veneno da centopeia *Cryptops iheringi*. 2020. 29 p. Trabalho de Conclusão de Curso Especialização em Toxinas de Interesse em Saúde – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2020.

Centopeias da classe Chilopoda constituem um grupo de artrópodes sinantrópicos com ampla distribuição global que estão envolvidos em vários relatos de humanos mordidos. Grande parte dos acidentes no estado de São Paulo tem sido relacionada às centopeias dos gêneros *Cryptops* e *Otostigmus*. O veneno desses animais contém vários compostos bioativos e dentre eles, as proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs) que são conhecidas como alérgenos. Embora as CRISPs já tenham sido descritas em transcrições da glândula de veneno em artrópodes, suas ações no veneno ainda permanecem desconhecidas. Portanto, a obtenção de uma dessas proteínas em forma recombinante pode ajudar a entender seu mecanismo de ação. Este presente trabalho tem como propósito clonar uma CRISP isolada da glândula de veneno de *C. iheringi* e expressá-la em um sistema bacteriano com o objetivo de avaliar sua atividade biológica. A partir das transcrições da glândula *C. iheringi*, a sequência CRISP foi isolada e usada para síntese de um gene sintético. Uma vez obtida, a sequência genética foi subclonada no vetor pSUMO_{ulp1}. A expressão bacteriana foi estabelecida utilizando-se a *E. coli* BL21 (DE3)-Star cultivada a 30 ° C por 16 horas com indução de IPTG em OD₆₀₀=0,6 . Embora uma grande parte tenha sido obtida na forma de corpos de inclusão, foi possível purificar uma pequena quantidade dessa proteína na forma solúvel, e posteriormente foi purificada por cromatografia de afinidade e avaliada por gel SDS-PAGE e Western blotting. Esta proteína será posteriormente utilizada para determinação de sua atividade biológica. Este estudo pode contribuir para elucidar as atividades biológicas e processos patológicos causados por essa proteína no envenenamento, e assim, pela primeira vez, descrever a atividade desse tipo de toxina para essa classe de veneno.

Palavras-chave: CRISP recombinante. *Cryptops iheringi*. Centopeia. Expressão em *E. coli*.

Sumário

1. Introdução	10
2. Materiais e Métodos	13
2.1. <i>Linhagens bacterianas</i>	13
2.2. <i>Vetores</i>	13
2.3. <i>Meio de cultura para bactérias Luria-Bertani (LB)</i>	13
2.4. <i>Placas ágar-LB /antibiótico</i>	14
2.5. <i>Eletroforese em gel de agarose</i>	14
2.6. <i>Eletroforese única dimensão de gel de acrilamida (1D- SDS-PAGE)</i>	14
2.7. <i>Obtenção de DNA plasmidial CRISP1</i>	14
2.8. <i>Clivagem e Purificação do gene sintético CRISP1</i>	15
2.9. <i>Obtenção de DNA plasmidial pSUMO_{ulp1}</i>	15
2.10. <i>Clivagem e Purificação da Construção do Vetor pSUMO_{ulp1}</i>	16
2.11. <i>Reação de Ligase e Transformação em bactérias competentes</i>	16
2.12. <i>Screening de colônias e PCR</i>	16
2.13. <i>Sequenciamento das construções clonadas</i>	17
2.14. <i>Obtenção de Plasmídeo das amostras Amplificadas</i>	17
2.15. <i>Expressão da proteína recombinante em E. coli</i>	18
2.16. <i>Purificação pelo cromatógrafo ÄKTA start</i>	18
2.17. <i>Processo de renaturação da CRISP recombinante purificada em condições denaturantes</i>	19
2.18. <i>Análise por immunoblotting</i>	19
3. Resultados e Discussão	20
4. Conclusão	25
5. Referências	26

1. Introdução

Animais invertebrados pertencentes ao filo Arthropoda e classe *Chilopoda* são popularmente conhecidos como centopeias. Anatomicamente, estes animais possuem corpo segmentado com diâmetros variáveis e com um par de patas por segmento, um único par de antenas e de forcípulas inoculadoras de veneno, bem como um par de glândulas de veneno localizado abaixo de cada forcípula (Bücherl 1939; Bücherl 1943; Fonseca 1949; Jangi *et al.*, 1984). Esses animais possuem hábitos alimentares preferencialmente carnívoros com dietas variadas incluindo insetos, lesmas, aranhas, assim como pequenos vertebrados como lagartos, aves e ratos constituindo assim, um grupo ecologicamente importante de predadores de solo e serapilheira (Bücherl 1946; Undheim e King 2011; Jangi *et al.*, 1984). São considerados animais sinantrópicos e com ampla distribuição global, apresentam hábitos noturnos, e frequentemente são encontrados em ambientes úmidos como jardins, depósitos de lixo, terrenos vagos, dentre outros (Bücherl 1939; Knysak *et al.*, 1994; Undheim *et al.*, 2015; Jangi *et al.*, 1984). Por ser uma classe de artrópodes peçonhentos adaptados às áreas urbanas e domésticas, acidentes com humanos são frequentemente relatados (Knysak *et al.*, 1998).

Acidentes por picadas de centopeia têm sido relatados no Brasil, estudos que abordam este tema ainda são escassos, porém, apontam que cerca de 90% dos acidentes ocorridos no estado de São Paulo estão relacionados principalmente aos gêneros *Cryptops* sp. e *Otostigmus* sp. (Medeiros *et al.*, 2008). Considerando ainda o estado de São Paulo, grande parte dos acidentes humanos envolvendo centopeias ocorre em áreas urbanas durante a realização de tarefas domésticas, as extremidades corporais como pés e mãos são as áreas mais acometidas pelas picadas. A sintomatologia do envenenamento é comumente descrita com sintomas locais como eritema, edema, hemorragia discreta no local da picada, dor ardente e cefalgia (Knysak *et al.*, 1998). O agravamento do envenenamento é raro porem pode levar a efeitos sistêmicos (Mumcuoglu e Leibovici, 1989; Harada *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 4 1999; Ozsarac *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Hasan e Hassan, 2005; Yildiz *et al.*, 2006).

Os efeitos descritos na sintomatologia contribuem para o entendimento da composição bioquímica do veneno de centopeias. Estudos bioquímicos e

farmacológicos realizados com os venenos de *Scolopendra viridicois*, *C. Iheringi* e *Ostostigmus pradoi*. (Malta *et al.*, 2008), demonstraram atividades predominantemente proteolíticas, como gelatinolíticas, caseinolíticas e fibrinogenolíticas. A presença destes compostos enzimáticos possibilita a correlação com as atividades edematogênicas, miotóxicas, nociceptivas, hemorrágicas e hemolíticas demonstradas por estes venenos. Podemos concluir dessa forma, que esses venenos são compostos por um conjunto complexo de moléculas bioativas, ainda pouco exploradas pela toxinologia.



Figura 1. Exemplar da espécie *Cyrtops iheringi*. Fonte: Antoniazzi *et al.* 2009.

Dentre os muitos compostos desse veneno podemos destacar as proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs). Esta classe de proteínas constituem uma família diversamente distribuída que foram descobertas e isoladas de vários tecidos animais como, por exemplo, do trato reprodutivo masculino de mamíferos (Kierszenbaum *et al.*, 1981), venenos de répteis (Mochca-Morales *et al.*, 1990; Hill e Mackessy, 2000; Yamazaki e Morita, 2004; Lodovicho *et al.*, 2017) e venenos de caramujos marinhos (Milne *et al.*, 2003; Gerdol *et al.*, 2019). As CRISPs têm demonstrado uma variedade diversificada de atividades biológicas desempenhadas tais como os efeitos de inibição de vários tipos de canais iônicos (Nobile *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1999; Yamazaki *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005), proteólises específicas (Milne *et al.*, 2003) e indução de hipotermia em presas (Mochca-Morales *et al.*, 1990). Descritas dentre os mais importantes alérgenos do veneno de vespas e formigas-fogo (*Solenopsis*. spp.) (Hoffman 2006) proteínas e peptídeos ricos em cisteína são responsáveis pela manifestação do quadro alérgico no envenenamento causado por

esses animais. Visto que essa característica alérgica também é descrita nos acidentes por centopeias, é plausível a correlação com a presença de CRISPs em seu veneno (Hakim *et al.*, 2015). Sendo assim, as CRISPs provenientes dos venenos de artrópodes se mostram um alvo promissor na pesquisa científica, uma vez que podem estar fortemente relacionadas a alguns dos principais efeitos do envenenamento.

Uma das limitações da pesquisa para o avanço da pesquisa com CRISPs em artrópodes está diretamente relacionada com a dificuldade na obtenção do veneno destes animais. O processo de extração do veneno exige experiência de quem executa e pode consumir muito tempo, além disso, o principal fator limitante é o baixo rendimento ao final do processo. Este rendimento é baixo mesmo para centopeias consideradas relativamente grandes como é o caso das espécies *Scolopendra polymorpha* (~ 10 cm) e *S. subspinipes* (~ 15 cm). Ambas as espécies podem produzir em média 1 e 5 μ L de veneno, respectivamente, quando obtidas por eletroestimulação (Cooper *et al.*, 2014). Estes fatores, em conjunto, ressaltam a importância de novos estudos na área de DNA recombinante.

Para proteínas, a tecnologia de DNA recombinante tem contribuído para solucionar tais fatores limitantes fornecendo um meio pelo qual podem ser sintetizadas em grandes quantidades (Chang *et al.*, 1997). Dessa forma, uma vez aumentada à disponibilidade e acessibilidade ao composto bioativo, pode auxiliar no maior entendimento da sintomatologia do envenenamento por centopeias e principalmente novas descobertas do potencial farmacológicos de proteínas do veneno.

Buscando contribuir para o melhor entendimento dos componentes do veneno de centopeias, o presente trabalho teve como objetivo clonar uma sequência de CRISP isolada da glândula de veneno de *C. iheringi* e produzi-la em um sistema bacteriano.

2. Materiais e Métodos

Os procedimentos abaixo descritos foram desenvolvidos em área de biossegurança nível NBII, com autorização da CIBio e CTNBio (Registro 6691/2019).

2.1. Linhagens bacterianas

2.1.1. DH5 α :

É a linhagem de *E. coli* mais utilizada para rotinas de clonagem, aumenta a estabilidade do inserto e favorece a qualidade do DNA plasmidial preparado para minipreps.

2.1.2. BL21 Star™(DE3) (Invitrogen®, USA): F⁻ *ompT hsdS_B (r_B-m_B⁻) gal dcm rne131* (DE3);

Bactérias utilizadas em rotinas de expressão, sendo que a designação (DE3) indica que o hospedeiro é um lisógeno do fago λ DE3 e, portanto, carrega uma cópia do gene da T7 RNA polimerase em seu cromossomo sob o controle do promotor lacUV5, induzível por IPTG (isopropylthio- β -galactoside).

2.2. Vetores

O vetor pSUMO_{ulp1} desenvolvido por Shimokawa-Falcão e colaboradores (2017), possui 6000pb e é projetado para a clonagem e expressão de alto nível de sequências fusionadas com a proteína SUMO, seguido por remoção da proteína de fusão dentro da bactéria. Seus sítios de clonagem são precedidos por um promotor T7 e local de ligação ao ribossomo, o vetor transporta gene lac I e o gene de resistência a cloranfenicol.

O vetor pET-39b+ (Novagen), é um vetor de 6106 pb com sítios de clonagem precedidos por um promotor T7, e local de ligação ao ribossomo e um peptideo DsbA para exportação para o periplasma, o vetor transporta gene lac I e o gene de resistência a Canamicina.

2.3. Meio de cultura para bactérias Luria-Bertani (LB)

O meio utilizado para a expansão bacteriana foi o Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base, USA, Invitrogen®) composto por 10 g de Triptona, 5 g extrato de

Levedura, 10 g de NaCl e H₂O para volume final de 1000 mL. Sendo esterilizado por autoclavagem durante 20 minutos à 121 °C.

2.4. Placas ágar-LB /antibiótico

Ao meio LB acima descrito adiciona-se 1,5 % de ágar, após total dissolução, o meio é esterilizado por autoclavagem durante 20 minutos a 121°C. Quando a temperatura do meio chega a cerca de 50°C, adiciona-se cloranfenicol (Calbiochem®, Alemanha) à uma concentração final de 34 µg/mL ou canamicina (Calbiochem®, Alemanha) à uma concentração final de 50µg/mL.

2.5. Eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses foram realizadas em 50 mL de tampão TAE 1X (Tris base 0,4 M, ácido acético glacial, EDTA 0,001 M, H₂O, pH 8), 1% de agarose, e corado com 1 µL de gel *Red™* (*Uniscience Corporation, Miami, USA*). As corridas foram submetidas a 80 V com 300 mA durante 40 minutos em tampão TAE 1X. As amostras de DNA foram coradas com tampão *Loading dye 6X* (*Fermentas Inc., Burlington, Ontario, Canadá*). Os tamanhos das bandas obtidas foram estimados através de comparação com o padrão de peso molecular *Ladder FastRuler* (*Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA*).

2.6. Eletroforese única dimensão de gel de acrilamida (1D- SDS-PAGE)

A proteína recombinante foi analisada por SDS-PAGE (resolução de acrilamida 12 %, Perce, USA) sob condições redutoras (Laemmli, 1970). Após separação da proteína por eletroforese os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 (GE Healthcare) (0,1% coomassie R-250, 40% etanol; 10% ácido acético) e descorado com solução descorante (20% metanol, 5% ácido acético), como padrão molecular foi utilizado padrão de peso molecular para proteínas *Middle Range protein Ladder, ready-to-use* (Thermo Fisher®). A eletroforese foi realizada em voltagem de 80 V e corrente de 300mA por gel.

2.7. Obtenção de DNA plasmidial CRISP1

A partir de colônias pré-existentes de bactérias competentes DH5 α possuindo o gene sintético CRISP1 presente no vetor pET-39b+, foram cultivadas em 10mL de meio de cultura LB com canamicina a 50 μ g/mL, deixadas na estufa à 37°C durante 16 horas, sob agitação de 167 rpm (rotações por minuto).

Em seguida, as culturas foram coletadas e realizado o processo de purificação plasmidial utilizando o kit de *PureYield™ Plasmid Miniprep System* da Promega® (Promega Corporation, Madison, W.I., U.S.A.) de acordo com as instruções do fabricante. Esse protocolo consiste na lise das bactérias utilizando diferentes tampões e lavagens com removedores de endotoxinas por meio de inúmeras centrifugações. Ao final, o DNA é obtido com alto grau de pureza em 30 μ L de água deionizada e livre de nucleases e o rendimento de 5 - 15 μ g.

2.8. Clivagem e Purificação do gene sintético CRISP1

Para as reações de clivagem, foi utilizada a proporção de 1U da enzima de restrição para cada 1 μ g de DNA diluídos em tampão próprio para cada enzima em água deionizada livre de nucleases para o ajuste do volume, de acordo com a recomendação do fabricante. As reações foram incubadas por 1 hora a 37°C. Assim, com os plasmídeos obtidos as clivagens foram realizadas com as enzimas de restrição, *HindIII FastDigest® enzymes Thermo Scientific™*, *XhoI FastDigest® enzymes Thermo Scientific™*.

Após confirmação da clivagem por corrida em gel de agarose, o próximo passo foi a purificação dos produtos a partir do gel. Para isso, foi utilizado o kit *Wizard® Plus SV Minipreps* da Promega® (Promega Corporation, Madison, W.I., U.S.A.) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, o protocolo de purificação consiste de 3 etapas: ligação do DNA plasmidial na minicoluna, sucessivas lavagens com os diferentes tampões incluindo ou não etanol em suas composições e com a presença de centrifugações seguida de eluição do material ligado à coluna com 30 μ L de água deionizada livre de nucleases.

2.9. Obtenção de DNA plasmidial pSUMO_{ulp1}

Bactérias competentes DH5 α contendo a construção do vetor plasmidial pSUMO_{ulp1} foram cultivadas em 104mL de meio de cultura LB com 34 μ g/mL de

antibiótico cloranfenicol e mantidas em estufa sob agitação de 167 RPM, à 37°C durante 16 horas. Em seguida, foi realizado o protocolo de purificação plasmidial acima descrito, em 30µL de água deionizada e livre de nucleases. Para confirmação da integridade do DNA plasmidial utilizou-se a visualização em gel de agarose.

2.10. *Clivagem e Purificação da Construção do Vetor pSUMO_{ulp1}*

O vetor pSUMO_{ulp1} obtido acima descrito foi incubado as enzimas de restrição *Xho*I, *Hind*III (1U de enzima para cada 1µg de DNA), seguindo o protocolo descrito para a obtenção da CRISP1. Em seguida, o material da digestão foi purificado como descrito no item 2.8. obtendo um volume de 30 µL de vetor em água deionizada e livre de nucleases.

2.11. *Reação de Ligase e Transformação em bactérias competentes*

A reação de ligação do inserto-CRISP1 com o vetor-pSUMO_{ulp1} foi efetuada utilizando uma unidade de T4 DNA Ligase *Invitrogen*TM (*Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA*), tampão de ligase próprio da enzima e água deionizada e livre de nucleases para o ajuste do volume, como recomendação do fabricante (proporção de 3 de inserto para 1 de vetor).

Após incubação de 72 horas, uma alíquota de 2 µL foi, então utilizada para transformar bactérias *E. coli* DH5α quimicamente competentes. Para tanto, o microtubo contendo as bactérias e o inserto+vetor foi colocado em banho a seco na temperatura de 42°C por 45 segundos, seguido de repouso em gelo por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio LB para as bactérias se recuperarem, sendo incubadas à 37°C com 450 rpm de agitação por 30 minutos. A cultura de bactérias foi centrifugada a 10.000 rpm por 1 minuto e ressuspensa em 200 µL de meio LB, e adicionadas à placa LB ágar contendo 34 µg/mL de cloranfenicol e incubadas por 16 horas à 37°C.

2.12. *Screening de colônias e PCR*

Após a incubação da placa em meio ágar, foi realizado o *screening* das colônias crescidas e portanto, contendo o CRISP1-pSUMO_{ulp1}. Pode-se verificar a presença de 16 colônias de CRISP1, as quais foram coletadas com ponteiros (100 µL) estéreis e

inoculadas em 20 μ L de meio LB contendo 34 μ g/mL de cloranfenicol e incubadas à 37°C, com agitação de 250 rpm, por 2 horas.

Após este período, 3 μ L de cada cultura foram utilizados para análise por PCR. Para isso, para cada amostra de cultura em um volume final de 20 μ L foram acrescentados: 0,4 mM dNTP; 0,6 mM MgCl₂; 1,0 μ L primer pSUMO₂seqfsumo; 1,0 μ L primer DuetDown; 0,1 μ L taq DNA polimerase e H₂O tridestilada) e realizada a reação de PCR usando a seguinte ciclagem: 94°C, por 3 minutos; 35 repetições 94°C por 45 segundos, 55°C por 3 segundos; 72°C, por 90 segundos; 72°C, por 10 minutos; 4°C ∞ . Como controle negativo, uma reação idêntica foi realizada onde os 3 μ L de cultura foram substituídos por água. Os produtos de reação de PCR foram analisados em gel de agarose à 1%. As colônias positivas e visivelmente amplificadas foram selecionadas e tiveram seus plasmídeos extraídos e as construções foram confirmadas por sequenciamento.

2.13. Sequenciamento das construções clonadas

Após cada etapa de clonagem, as construções obtidas foram submetidas ao sequenciamento utilizando-se o kit *ABI Prism® Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) o qual combina a *AmpliTaQ®* DNA Polimerase, terminadores *BigDye* e dNTPs. Para cada reação de sequenciamento foi utilizado somente um oligo. Como o sequenciamento geralmente fornece uma sequência de aproximadamente 450 pb, foram utilizados os oligos senso ou antisenso correspondentes a região a ser sequenciada. Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. Os resultados das sequências foram analisados e alinhados utilizando o programa *DnaStar SeqMan™II*.

2.14. Obtenção de Plasmídeo das amostras Amplificadas

Após a confirmação no gel de agarose da presença das ampliações da pSUMO_{ulp}¹-CRISP nas colônias de bactérias, foram coletados 15 μ L de cada cultura e estes foram inoculados em 15 mL de meio de cultura LB contendo 15 μ L do antibiótico cloranfenicol. Em seguida, essas culturas foram mantidas em estufa a 37°C, sob agitação de 167 rpm durante 16 horas. Após a incubação, as culturas foram coletadas e realizada a purificação do DNA recombinante conforme metodologia já descrita.

Foram utilizados 3 μ L do DNA para transformação de bactérias *E. coli* DH5 α quimicamente competentes e foram adicionadas à placa LB ágar contendo 34 μ g/mL de cloranfenicol e incubadas por 16 horas à 37°C. Após a clonagem a construção foi denominada pSUMO_{ulp1}-CRISP.

2.15. *Expressão da proteína recombinante em E. coli*

Para a expressão da proteína recombinante foi utilizada a cepa de *E. coli* BL21 Star™(DE3). Para isso, a bactéria BL21Star(DE3) foi preparada para torna-se competente pelo método do cloreto de cálcio. Em seguida, o inserto contendo a CRISP1 foi utilizado para transformar as bactérias por meio de choque térmico e, ao final as bactérias foram plaqueadas em LB-ágar contendo 34 μ g/mL de cloranfenicol e incubadas por 16 horas a 37° C. Depois uma colônia selecionada foi inoculada em 200 mL de meio LB com 34 μ g/mL de cloranfenicol, e incubada a 37°C com agitação de 190 rpm também por 16 horas.

No dia seguinte, uma alíquota da cultura (diluição 1:70) foi adicionada em meio LB com a mesma concentração de antibiótico. A cultura foi incubada a 30°C sob agitação de 170 rpm até atingir a fase logarítmica de crescimento exponencial (DO₆₀₀= 0,5 a 0,6). Após atingir a densidade ótica esperada, foi adicionado 1 mM de IPTG à cultura seguida de incubação por 4h a 30 °C. O volume de cultura foi centrifugado à 10.000 xg sob a temperatura de 4°C por 30 minutos. O sobrenadante descartado e o sedimento bacteriano armazenado a -20°C.

2.16. *Purificação pelo cromatógrafo ÄKTA start*

A purificação da proteína recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade a Niquel-sepharose em sistema ÄKTA start, de acordo com o protocolo do fabricante e seguindo os seguintes parâmetros: Limite de pressão 5 bar em todos os ciclos, carregamento da amostra a 0,2 mL/min, lavagem de coluna a 2mL por minuto. A água e soluções foram filtrados e esterilizados. Para o protocolo de purificação foram utilizadas as seguintes soluções: solução de ligação (fosfato de sódio 20 mM, 500 mM cloreto de sódio, pH 7,5) e solução de eluição (fosfato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 500 mM, imidazol 500 mM pH 7,5). Frações e picos ainda foram identificados através da absorção de UV, também parâmetros como condutividade e pressão

puderam ser observados. As frações de 2 mL do pico de eluição foram recolhidas para posterior análise.

2.17. *Processo de renaturação da CRISP1 recombinante purificada em condições desnaturantes*

Após a purificação da CRISP em condições desnaturantes utilizando 6M de ureia, a proteína recombinante foi submetida à diálise em tampão TBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) contendo 3 mM de DTT (Dithiothreitol) com diminuição sucessiva da concentração de ureia no tampão TBS de acordo com o descrito abaixo:

- Primeira diálise com concentração de 4M de ureia por 6 horas
- Segunda diálise com concentração de 2M de ureia por 12 horas
- Terceira diálise com concentração de 1M de ureia por 6 horas
- Quarta diálise com concentração de 0,5M de ureia por 6 horas
- Quinta diálise em tampão TBS sem ureia por 6 horas

O sobrenadante e o precipitado, após a última diálise, foram coletados e analisados em gel de SDS-PAGE 12,5% em condições redutoras.

2.18. *Análise por immunoblotting*

Amostras da proteína recombinante e uma proteína não relacionada (controle positivo proteína verde fluorescente-EGFP) foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE em condições redutoras. Posteriormente, o gel foi submetido a uma corrente constante de 200 mA durante 2 horas para realizar a transferência das proteínas para membranas de nitrocelulose utilizando o Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad®).

Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas com *Ponceau S* (Merk®) (diluído 1:20) para verificar a eficiência da transferência. Para retirar o corante, as membranas foram lavadas com TBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) até completa remoção do mesmo. Posteriormente, as membranas foram incubadas sob agitação por 2 horas a 4 °C com solução bloqueadora (Tris/NaCl, pH 7,5 contendo 5% de leite em pó desnatado) e então lavadas com TBS contendo 0,05% de Tween 20. Subsequentemente as membranas foram incubadas por 2 horas em tampão de incubação (Tris/NaCl, pH 7,5 contendo 5% de leite desnatado) com

anticorpo monoclonal anti-histidina *Sigma*-Aldrich em uma diluição de 1/1000. Após esse período, as membranas foram lavadas 3 vezes por 15 minutos com TBS–Tween e incubadas por 2 horas com o conjugado imunoenzimático *Sigma*-Aldrich (anti-IgG de camundongo marcados com peroxidase) na diluição 1/3000 em tampão de incubação. O excesso do conjugado foi, então removido por um novo ciclo de lavagens e os componentes antigênicos foram revelados pela adição do cromógeno 4-cloro-1 α -naftol 0,05% (p/v) em Metanol 15% (v/v) em presença de 0,03% de H₂O₂ (v/v). A reação foi interrompida por sucessivas lavagens com água corrente.

3. Resultados e Discussão

Como já sabido, as CRISP constituem uma família de proteínas amplamente distribuídas em diferentes tecidos animais, como do trato reprodutivo masculino de mamíferos, venenos de reptéis e venenos de caramujos marinhos. Descritas dentre os mais importantes alérgenos do veneno de vespas e formigas-fogo (*Solenopsis* spp.) (Hoffman, 2006), proteínas e peptídeos ricos em cisteínas são responsáveis pela manifestação do quadro alérgico no envenenamento causado por esses animais, esta característica alérgica também é descrita nos acidentes por centopeias, portanto podem ter correlação com a presença de CRISPs em seu veneno (Hakim *et al.*, 2015). Estudos recentes relataram em seus dados transcriptômicos a presença de CRISPs na glândula de veneno de centopeias, assim como também em venenos de aranhas como as, *Phoneutria nigriventer* e *P. keyserlingi* e as *Grammostola iheringi* e *Acanthoscurria natalensis*, conhecidas popularmente como aranhas armadeiras e aranhas caranguejeiras, respectivamente (Borges *et al.*, 2016; Diniz *et al.*, 2018; Barth *et al.*, 2019). As CRISPs, apesar de já serem descritas em artrópodes, ainda não foram isoladas e não possuem suas atividades biológicas descritas. Dessa forma, a fim de contribuir para o conhecimento científico acadêmico que temos a respeito do veneno dos animais da classe Chilopoda, neste trabalho isolamos a sequência de uma CRISP de *C. iheringi* a partir da glândula de veneno deste artrópode, realizamos sua clonagem e expressão em sistema bacteriano.

Para obtenção da sequência primária desta toxina foi realizada uma busca de sua sequência no transcriptoma da centopeia, o cDNA obtido foi otimizado para

expressão em bactéria previamente clonado no vetor pET39b. No entanto, após o processo de expressão, não foi possível obter a proteína na forma solúvel (dados não apresentados). Devido a características de elevada complexidade estrutural, tentativas anteriores de produzir CRISPs funcionais recombinantes têm sido desafiadoras. Esta limitação provavelmente está ligada a dificuldade com que os resíduos de cisteína têm de formar pontes dissulfeto em modelos de produção de proteína heteróloga, uma vez que estas pontes se formam a partir da redução das cadeias laterais dos aminoácidos cisteína. Inúmeras tentativas foram feitas para expressar e purificar proteínas usando sistemas heterólogos de expressão bacterianos e mamíferos (Gibbs *et al.*, 2006; Gibbs *et al.*, 2011; Volpert *et al.*, 2014). No entanto, eles resultaram na produção de baixos rendimentos proteicos, proteína recombinante desdobrada e proteínas presas em corpos de inclusão insolúveis (Derman *et al.*, 1993; Gaiakwad *et al.*, 2020). Portanto, para continuidade do trabalho, iniciamos uma nova estratégia de subclonagem com o vetor pSUMO_{ulp1} (Shimokawa-Falcão *et al.*, 2017), onde a proteína de fusão SUMO está presente e muitos trabalhos indicam que o uso desta proteína colabora para a solubilização de proteínas de difícil expressão.

Desta maneira, a sequência da CRISP foi inserida no vetor pSUMO_{ulp1} e uma aliquota do produto de ligação foi transformado em bactérias DH5α quimicamente competentes por meio de choque térmico, e foram plaqueadas para seleção de clones positivos. Após análise por PCR, clones positivos foram selecionados e clivados com as enzimas Hind III e Xho I para verificar sua correta inserção nos sítios de clonagem (Figura 2). Posteriormente o clone também foi submetido a sequenciamento para assegurar que a construção estava correta. A nova construção foi denominada pSUMO_{ulp1}-CRISP.

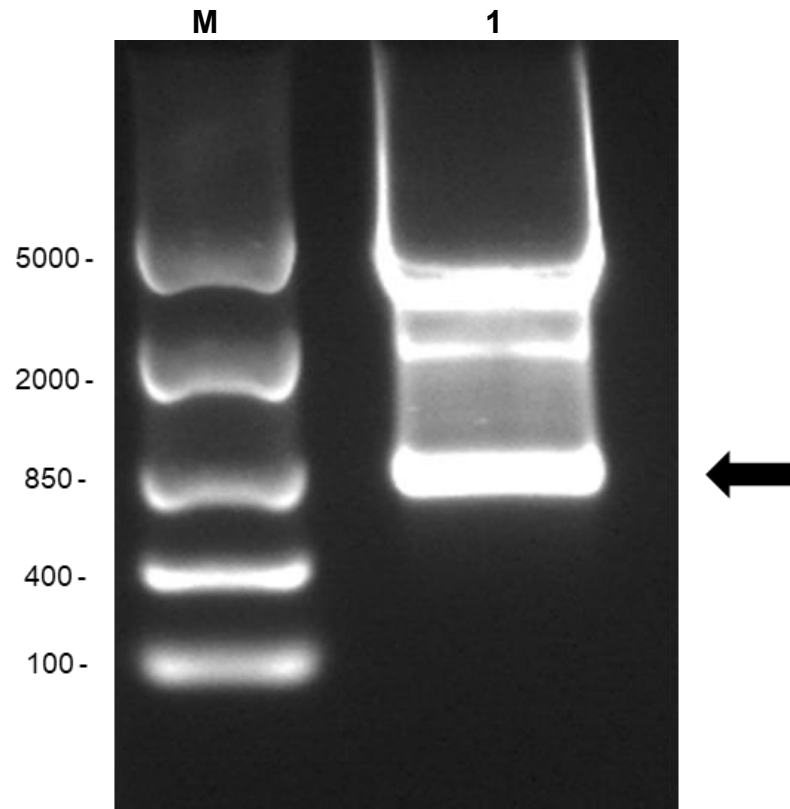


Figura 2. A) Confirmação da clonagem através do gel de agarose e as enzimas de restrição clivando o vetor pSUMO_{ulp1} para liberação do inserto CRISP. Os números do lado esquerdo correspondem a posição do marcador de massas molecular (**M**) em kDa. (**1**) vetor pSUMO_{ulp1} clivado com as enzimas Xho I e BamHI para liberação do inserto da CRISP indicado pela seta na altura de 771pb.

Com êxito na clonagem, iniciamos a etapa de expressão da proteína recombinante, para tanto uma alíquota da construção pSUMO_{ulp1} – CRISP foi transformada em cepas de *E. coli*, BL21 star (DE3). Após vários testes com temperaturas distintas, verificamos que a temperatura de 30°C foi a ideal para a expressão da proteína recombinante. Para verificar a presença da proteína recombinante, uma alíquota da cultura antes e após a indução com 1mM de IPTG foi retirada para avaliação por eletroforese em gel de SDS. Como pode ser observado na Figura 3, linha 2, na altura esperada de 30kDa, há uma banda correspondente a expressão da proteína recombinante após 4h de indução.

Para confirmar que a expressão se tratava da CRISP, esta foi submetida a um Western blotting com revelação utilizando o anticorpo anti-His que detecta a presença da cauda de histidina presente porção C-terminal da CRISP (Fig. 3B)

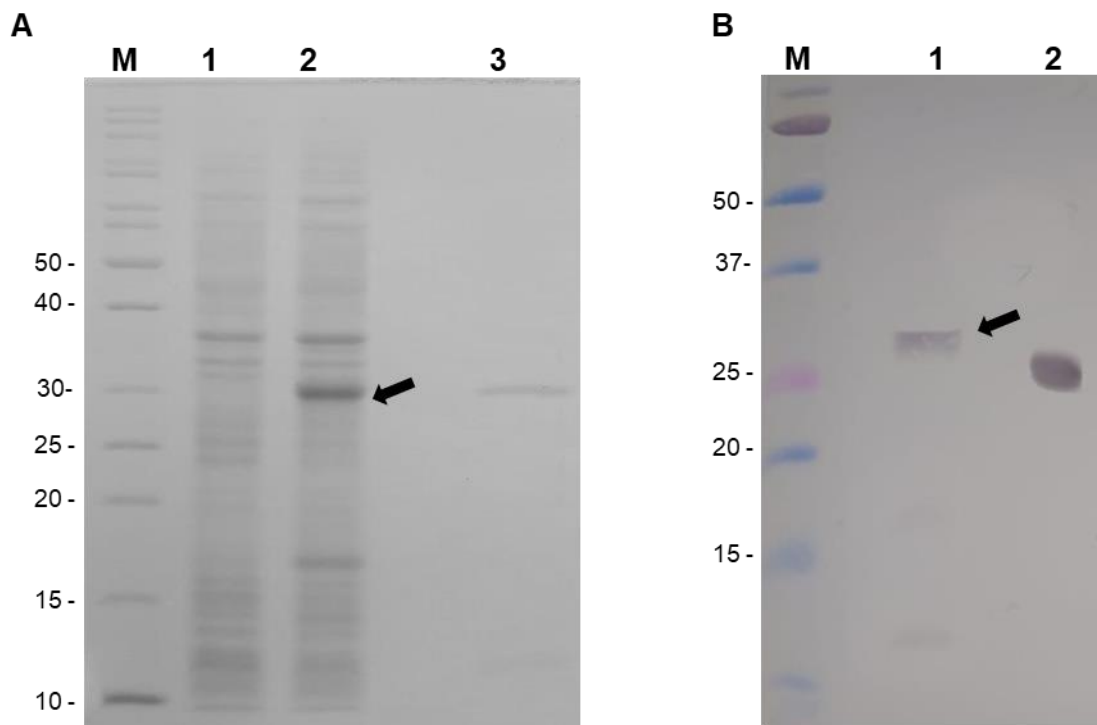


Figura 3. A) Análise da expressão da CRISP por gel SDS-PAGE 13,5% em condições redutoras corado com Coomassie blue, onde é possível observar a expressão CRISP (seta) expressa em *E. coli* BL21 Star™ (DE3). Os números do lado esquerdo correspondem à posição do marcador de massas molecular **(M)**. **(1)** e **(2)**: correspondem a alíquota da bactéria BL21 Star™ (DE3) antes e depois da indução por IPTG respectivamente; **(3)**: purificação e diálise das proteínas CRISP, na altura esperada de 30 kDa. **(B)** Western blot da proteína CRISP utilizando o anticorpo anti-His. **(M)** representa o marcador de massas molecular. **(1)** corresponde a proteína CRISP indicada com a seta e **(2)** corresponde a controle positivo, proteína verde fluorescente-EGFP.

Com o uso do plasmídeo pSUMO_{ulp1}, a toxina, além de ter sido expressa em fusão com a SUMO, apresenta uma cauda de 6 histidinas em sua porção C-terminal, tornando possível sua purificação através da ligação com uma resina de matriz de níquel utilizando o aparelho ÄKTA start. A eluição da proteína foi feita com concentrações crescentes de imidazol e após a purificação realizamos a diálise contra PBS. Obtivemos a proteína purificada conforme observado na Figura 3 (coluna 3), que apresentou um rendimento de 300 µg/L. Como grande parte da proteína apresentava-se insolúvel (corpúsculo de inclusão), tentamos melhorar o rendimento através de solubilização do corpúsculo com 6M de ureia, com posterior *refolding* por diálise, mas o procedimento não foi eficaz (dados não mostrados).

Considerando o potencial alergênico da CRISP e o papel crucial dos mastócitos como um elemento desencadeador do edema, como próxima etapa para avaliar a

atividade da CRISP recombinante obtida, iremos avaliar a capacidade da proteína recombinante de induzir a desgranulação de mastócitos em modelo *in vitro*.

4. Conclusão

Neste trabalho foram obtidas com sucesso a clonagem e expressão da proteína CRISP presente no transcriptoma da glândula de *C. iheringi*. A obtenção desta toxina na forma recombinante, devido a limitada quantidade de veneno para sua purificação, irá auxiliar na determinação da atividade desta toxina presente no veneno, o que poderá contribuir para um melhor tratamento dos acidentados ou exploração biotecnológica desta toxina.

5. Referências

ANTONIAZZI, Marta M. et al. Comparative morphological study of the venom glands of the centipede *Cryptops iheringi*, *Otostigmus pradoi* and *Scolopendra viridicornis*. **Toxicon**, v. 53, n. 3, p. 367-374, 2009.

BARTH, Tania et al. Biochemical and structural characterization of a protein complex containing a hyaluronidase and a CRISP-like protein isolated from the venom of the spider *Acanthoscurria natalensis*. **Journal of proteomics**, v. 192, p. 102-113, 2019.

BORGES, Marcia GIBBS, Gerard M. et al. The cysteine-rich secretory protein domain of Tpx-1 is related to ion channel toxins and regulates ryanodine receptor Ca²⁺ signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 7, p. 4156-4163, 2006.

BORGES, Márcia H. et al. Venomous extract protein profile of Brazilian tarantula *Grammostola iheringi*: searching for potential biotechnological applications. **Journal of proteomics**, v. 136, p. 35-47, 2016.

BROWN, R. Lane et al. Pseudechetoxin: a peptide blocker of cyclic nucleotide-gated ion channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 2, p. 754-759, 1999.

BÜCHERL, W. Ação do veneno dos escolopendromorfos do Brasil sobre alguns animais de laboratório. **Memórias do Instituto Butantã**. v 19: 181-198, 1946.

BÜCHERL, W. Quilópodos do Brasil. **Memórias do Instituto Butantã**. v 23: 1-320, 1939.

BÜCHERL, W. Quilópodos do Peru. **Memórias do Instituto Butantã**. Tomo XVII, p. 19-27, 1943.

CHANG, Tseng-Yuan; MAO, Shou-Hsian; GUO, Yaw-Wen. Cloning and expression of a cysteine-rich venom protein from *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan habu). **Toxicon**, v. 35, n. 6, p. 879-888, 1997.

COOPER, Allen M. et al. Variation in venom yield and protein concentration of the centipedes *Scolopendra polymorpha* and *Scolopendra subspinipes*. **Toxicon**, v. 82, p. 30-51, 2014.

DERMAN, Alan I. et al. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Science**, v. 262, n. 5140, p. 1744-1747, 1993.

DINIZ, Marcelo RV et al. An overview of *Phoneutria nigriventer* spider venom using combined transcriptomic and proteomic approaches. **PloS one**, v. 13, n. 8, 2018.

FONSECA F. Miriápodes. In: Fonseca F (ed) **Animais peçonhentos**. São Paulo, p. 251-254, 1949.

GAIKWAD, Avinash S. et al. Expression and purification of recombinant mouse CRISP4 using a baculovirus system. **Protein Expression and Purification**, v. 167, p. 105543, 2020.

GERDOL, Marco et al. A Recurrent Motif: Diversity and Evolution of ShKT Domain Containing Proteins in the Vampire Snail *Cumia reticulata*. **Toxins**, v. 11, n. 2, p. 106, 2019.

GIBBS, Gerard M. et al. Cysteine-rich secretory protein 4 is an inhibitor of transient receptor potential M8 with a role in establishing sperm function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 17, p. 7034-7039, 2011.

HAKIM, Md Abdul; YANG, Shilong; LAI, Ren. Centipede venoms and their components: resources for potential therapeutic applications. **Toxins**, v. 7, n. 11, p. 4832-4851, 2015.

HARADA, Kazuki et al. Centipede inflicted postmortem injury. **Journal of Forensic Science**, v. 44, n. 4, p. 849-850, 1999.

HASAN, Shadi; HASSAN, Kamal. Proteinuria associated with centipede bite. **Pediatric Nephrology**, v. 20, n. 4, p. 550-551, 2005.

HILL, Robert E.; MACKESSY, Stephen P. Characterization of venom (Duvernoy's secretion) from twelve species of colubrid snakes and partial sequence of four venom proteins. **Toxicon**, v. 38, n. 12, p. 1663-1687, 2000.

HOFFMAN, Donald R. Hymenoptera venom allergens. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 30, n. 2, p. 109-128, 2006.

JANGI, B.S., 1984. Centipede venoms and poisoning. In: Tu, A.T. (Ed.), **Handbook of Natural Toxins: Insect Poisons, Allergens, and Other Invertebrate Venoms**. Marcel Dekker, New York, pp. 333–368.

JIN, Yang et al. Purification and cloning of cysteine-rich proteins from *Trimeresurus jerdonii* and *Naja atra* venoms. **Toxicon**, v. 42, n. 5, p. 539-547, 2003.

KIERSZENBAUM, A. L. et al. Isolation, culture, and immunocytochemical characterization of epididymal epithelial cells from pubertal and adult rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 3, p. 1675-1679, 1981.

KNYSAK, I. et al. Lacraias de importância médica no estado de São Paulo: biologia e aspectos epidemiológicos. **São Paulo, Centro de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Estado da Saúde**, 4p, 1994.

KNYSAK, Irene; MARTINS, Rosana; BERTIM, Carlos R. Epidemiological aspects of centipede (Scolopendromorphae: Chilopoda) bites registered in greater S. Paulo, SP, Brazil. **Revista de saude publica**, v. 32, p. 514-518, 1998.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LODOVICO, Marina E. et al. Investigating possible biological targets of Bj-CRP, the first cysteine-rich secretory protein (CRISP) isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicology letters**, v. 265, p. 156-169, 2017.

MALTA, Marilia B. et al. Toxic activities of Brazilian centipede venoms. **Toxicon**, v. 52, n. 2, p. 255-263, 2008.

MEDEIROS, C. R. et al. Epidemiologic and clinical survey of victims of centipede stings admitted to Hospital Vital Brazil (São Paulo, Brazil). **Toxicon**, v. 52, n. 5, p. 606-610, 2008.

MILNE, Trudy J. et al. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 33, p. 31105-31110, 2003.

MOCHCA-MORALES, Javier; MARTIN, Brian M.; POSSANI, Lourival D. Isolation and characterization of helothermine, a novel toxin from *Heloderma horridum horridum* (Mexican beaded lizard) venom. **Toxicon**, v. 28, n. 3, p. 299-309, 1990.

NOBILE, M. et al. The toxin helothermine affects potassium currents in newborn rat cerebellar granule cells. **The Journal of membrane biology**, v. 139, n. 1, p. 49-55, 1994.

OZSARAC, Murat et al. Acute coronary ischemia following centipede envenomation: case report and review of the literature. **Wilderness & Environmental Medicine**, v. 15, n. 2, p. 109-112, 2004.

SHIMOKAWA-FALCÃO, Lhira HAL et al. Toxin fused with SUMO tag: a new expression vector strategy to obtain recombinant venom toxins with easy tag removal inside the bacteria. **Toxins**, v. 9, n. 3, p. 82, 2017.

UNDHEIM, Eivind AB; FRY, Bryan G.; KING, Glenn F. Centipede venom: recent discoveries and current state of knowledge. **Toxins**, v. 7, n. 3, p. 679-704, 2015.

UNDHEIM, Eivind AB; KING, Glenn F. On the venom system of centipedes (Chilopoda), a neglected group of venomous animals. **Toxicon**, v. 57, n. 4, p. 512-524, 2011.

VOLPERT, Marianna et al. Eukaryotic expression, purification and structure/function analysis of native, recombinant CRISP3 from human and mouse. **Scientific reports**, v. 4, p. 4217, 2014.

WANG, Changsen et al. Expression and purification of the first nucleotide-binding domain and linker region of human multidrug resistance gene product: comparison of fusions to glutathione S-transferase, thioredoxin and maltose-binding protein. **Biochemical Journal**, v. 338, n. 1, p. 77-81, 1999.

WANG, I.-Kuan et al. Rhabdomyolysis, acute renal failure, and multiple focal neuropathies after drinking alcohol soaked with centipede. **Renal failure**, v. 26, n. 1, p. 93-97, 2004.

WANG, Jing et al. Blocking effect and crystal structure of natrin toxin, a cysteine-rich secretory protein from *Naja atra* venom that targets the BKCa channel. **Biochemistry**, v. 44, n. 30, p. 10145-10152, 2005.

YAMAZAKI, Yasuo; BROWN, R. Lane; MORITA, Takashi. Purification and cloning of toxins from elapid venoms that target cyclic nucleotide-gated ion channels. **Biochemistry**, v. 41, n. 38, p. 11331-11337, 2002.

YAMAZAKI, Yasuo; MORITA, Takashi. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 227-231, 2004.

YANIMUMCUOGLU, KOSTA; LEIBOVICI, V. Centipede (*Scolopendra*) bite: a case report. **Israel journal of medical sciences**, v. 25, n. 1, p. 47-49, 1989.

YILDIZ, A. et al. Acute myocardial infarction in a young man caused by centipede sting. **Emergency Medicine Journal**, v. 23, n. 4, p. e30-e30, 2006.