
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Lucas Machado Pinto

Expressão e avaliação da atividade da
hialuronidase (Poly p 2) do veneno de *Polybia*
paulista (Hymenoptera: Vespidae) em *Escherichia*
coli sob baixas temperaturas

Rio Claro – SP
Ano 2021

Lucas Machado Pinto

Expressão e avaliação da atividade da hialuronidase (Poly p 2) do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae) em *Escherichia coli* sob baixas temperaturas

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Brochetto Braga
Coorientadora: Ma. Camila Cristiane Pansa

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro – SP

2021

P659e

Pinto, Lucas Machado

Expressão e avaliação da atividade da hialuronidase (Poly p 2) do veneno de *Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae) em *Escherichia coli* sob baixas temperaturas / Lucas Machado Pinto. -- Rio Claro, 2021
29 f. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Márcia Regina Brochetto Braga
Coorientadora: Camila Cristiane Pansa

1. Biologia molecular. 2. *Escherichia coli*. 3. Himenóptero. 4. Proteínas recombinantes. 5. Redobrimento de Proteína. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, Marcos e Sidynea por todo amor, apoio e confiança que me permitiram buscar meus sonhos, vocês foram meus guias nos caminhos da vida e sem vocês eu nada seria. Vocês sempre serão meus maiores exemplos de bondade e amor.

À minha esposa Miyuki por me apoiar e estar ao meu lado em todos os momentos mais importantes da minha vida, seja como amiga ou companheira. Obrigado por me incentivar a prestar o vestibular, pela dedicação em me ensinar os assuntos mais básicos, por viver ao meu lado por todos os anos durante a graduação sem importar as dificuldades, você é o amor da minha vida.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Brochetto Braga, por ter me recebido em seu laboratório, por todo ensinamento e oportunidades. Agradeço imensamente pela orientação e paciência que foram fundamentais para o início da minha formação científica.

À minha coorientadora e amiga Camila Cristiane Pansa por ser meu guia e exemplo, pela paciência infinita em me explicar quantas vezes fossem necessárias até que eu adquirisse confiança.

Aos meus amigos e companheiros do laboratório de Biologia Molecular de Artrópodes, Murilo e Isabela, por me receberem tão bem e me fazer sentir parte da equipe, por tudo que me ensinaram com total dedicação e empenho e também por toda amizade construída.

Agradeço também à todos amigos que fiz na graduação, Aryel, Amanda, Beatriz, Ryu e Márcio, que estiveram ao meu lado e me ajudaram tanto para chegar ao fim do curso, o apoio de cada um de vocês foi fundamental.

Por fim, agradeço minha sogra Ilda Suiama (Sumiko), pela confiança e o grande apoio para meu ingresso e permanência na faculdade, por todos os conselhos e ensinamentos que vou levar por toda vida.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – IB, RIO CLARO – SP
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL E APLICADA

Trabalho de Conclusão de Curso

Expressão e avaliação da atividade da hialuronidase (rPoly p 2) do veneno de
Polybia paulista (Hymenoptera: Vespidae) em *Escherichia coli* sob baixas
temperaturas

Aluno: Lucas Machado Pinto

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Brochetto Braga

Coorientadora: Ma. Camila Cristiane Pansa

Resumo

A hialuronidase (HIAL) é uma enzima amplamente distribuída na natureza, sendo encontrada no veneno de invertebrados, vertebrados e em órgãos e fluídos humanos. Essa enzima atua como um fator de difusão, pela degradação do ácido hialurônico, que compõe a matriz extracelular de vertebrados, podendo assim, ser utilizada como adjuvante para aumentar a dispersão e absorção de drogas farmacológicas injetáveis. Devido às baixas quantidades de hialuronidase encontradas na natureza e seu difícil isolamento, a produção desta enzima tem sido realizada por meio de sistemas de expressão heterólogos, sendo o mais usual, a bactéria *Escherichia coli*. Entretanto, devido à falta de maquinário pós-traducional, grande parte das proteínas são expressas em *E.coli* de forma insolúvel, necessitando do processo de *refolding* (reenovelamento) para se tornarem biologicamente ativas, o que muitas vezes causa perda de parte do material. Sendo assim, visando futuras aplicações biotecnológicas desta enzima, este estudo buscou obter e otimizar a expressão recombinante da hialuronidase do veneno da vespa *Polybia paulista* (rPoly p 2; 39kDa) em *E. coli*, na forma solúvel e ativa, por meio de baixas temperaturas de expressão – 8°C, 10°C e 12°C. Em paralelo, os corpos de inclusão obtidos nestes processos, foram solubilizados e as proteínas submetidas ao *refolding* objetivando recuperar a atividade da enzima. Os resultados mostraram uma maior produtividade de rPoly p 2 na forma solúvel e ativa quando expressa a 10°C por 48h, relativamente às temperaturas de 8 e 12°C. Por outro lado, os tratamentos de solubilização dos corpos de inclusão e *refolding*, não foram eficientes para a recuperação da enzima sob as condições aqui testadas. A avaliação e comparação dos níveis de atividade

enzimática entre os tratamentos demonstrou níveis significativos de atividade da rPoly p 2 proveniente das frações solúveis em relação àqueles obtidos nos processos de *refolding* e do controle positivo (ryPoly p 2) expresso em levedura *Komagataella phaffii*. No entanto, nenhum dos tratamentos atingiu os níveis de atividade hialuronidásica observado no extrato de veneno bruto de *P. paulista*. Estes dados, além de mostrarem a viabilidade do uso do sistema procarioto na produção dessa enzima em sua forma solúvel, também indicam que uma significativa economia nos custos de purificação desta proteína pode ser alcançada, o que é extremamente relevante em termos biotecnológicos

Palavras chave: hialuronidase, expressão heteróloga, *refolding*, *Escherichia coli*, *Polybia paulista*, veneno de vespa.

Abstract

Hyaluronidase (HYAL) is an enzyme widely distributed in nature, found in the venom of invertebrates, vertebrates and in human organs and fluids. This enzyme acts as a diffusion factor, through the degradation of hyaluronic acid, which makes up the extracellular matrix of vertebrates, and can thus be used as an adjuvant to increase the dispersion and absorption of injectable pharmacological drugs. Due to the low amounts of hyaluronidase found in nature and its difficult isolation, the production of this enzyme has been carried out through heterologous expression systems, the most common being the bacterium *Escherichia coli*. However, due to the lack of post-translational machinery, most of the proteins are expressed in *E. coli* in an insoluble form, requiring the refolding process to become biologically active, which often causes the loss of part of the material. Therefore, aiming at future biotechnological applications of this enzyme, this study sought to obtain and optimize the recombinant expression of hyaluronidase from *Polybia paulista* wasp venom (rPoly p 2; 39kDa) in *E. coli*, in soluble and active form, by means of low temperatures of expression – 8°C, 10°C and 12°C. In parallel, the inclusion bodies obtained in these processes were solubilized and the proteins subjected to refolding in order to recover the enzyme activity. The results showed a higher productivity of rPoly p 2 in soluble and active form when expressed at 10°C for 48h, compared to temperatures of 8 and 12°C. On the other hand, the inclusion body solubilization and refolding treatments were not efficient for the enzyme recovery under the conditions tested here. The evaluation and comparison of enzyme activity levels between treatments showed significant levels of rPoly p 2

activity from the soluble fractions in relation to those obtained from the refolding processes and from the positive control (ryPoly p 2) expressed in *Komagataella phaffii* yeast. However, none of the treatments reached the levels of hyaluronidase activity observed in the crude venom extract of *P. paulista*. These data, in addition to showing the feasibility of using the prokaryote system in the production of this enzyme in its soluble form, also indicate that a significant saving in the costs of purification of this protein can be achieved, which is extremely relevant in biotechnological terms.

Key words: hyaluronidase, heterologous expression, refolding, *Escherichia coli*, *Polybia paulista*, wasp venom.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	8
2.OBJETIVO.....	11
2.1 Objetivos específicos.....	11
3.MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Expressão da rPoly p 2 (hialuronidase de <i>P. paulista</i> expressada em <i>E. coli</i>).....	11
3.2 Ruptura celular e solubilização do precipitado de rPoly p 2.....	12
3.3 Purificação de rPoly p 2 – Sobrenadante e solubilizado	12
3.4 Reenovelamento (<i>Refolding</i>)	13
3.5 Expressão de ryPoly p 2 em <i>Komagataela phaffii</i> (<i>Pichia pastoris</i>).....	14
3.6 Purificação de ryPoly p 2 (hialuronidase de <i>P. paulista</i> expressada em <i>K. phaffii</i>).....	14
3.7 Atividade enzimática de Poly p 2 nas formas nativa (nPoly p 2, no veneno bruto de <i>P. paulista</i>) e recombinante expressa em <i>E. coli</i> (r Poly p 2) e em <i>K. phaffii</i> (ry Poly p 2)	15
3.8 Análises estatísticas.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 Expressão de rPoly p 2 na forma recombinante em <i>E. coli</i> e <i>K. phaffii</i>	16
4.2 Solubilização dos corpúsculos de inclusão contendo rPoly p 2	18
4.3 Purificação da rPoly p 2 (sobrenadante e solubilizado) e ryPoly p 2.....	20
4.4 Atividade enzimática de hialuronidase.....	22
4. CONCLUSÕES	25
5. REFERÊNCIAS.....	26

1.INTRODUÇÃO

A enzima hialuronidase (HIAL), é amplamente distribuída na natureza, compondo parte do veneno de animais invertebrados e vertebrados (BORDON et al., 2015), além de órgãos e fluídos humanos (GOLD, 1982; KHAN et al., 2018; STERN; JEDRZEJAS, 2006). A principal função dessa enzima é a decomposição do ácido hialurônico, um glicosaminoglicano de alta massa molecular e um dos principais componentes da matriz extracelular de vertebrados (LAURENT; FRASER, 1992; STERN; JEDRZEJAS, 2006; JUSTO JACOMINI et al., 2013; PEREZ-RIVEROL et al., 2017). A atividade da hialuronidase é modulada por ativadores, tais como adrenalina, histamina e fosfatase ácida presente no rim, fígado, próstata, eritrócitos e plaquetas, e também por seus inibidores anti-histamínicos como salicilatos, heparina, dicumarina, vitamina C e flavonóides (LI et al., 1997; MENZEL; FARR, 1998; BORDON et al., 2015).

A HIAL não possui atividade tóxica, porém atua como um fator de difusão (DURAN-REYNALS, 1933; MOREY; KIRAN; GADAG, 2006; BORDON et al., 2015), pois ao atuar sobre os glicosaminoglicanos dos interstícios celulares, gera a produção de pequenos fragmentos e consequentemente uma redução na viscosidade e maior facilidade na propagação de drogas farmacológicas e também dos demais componentes dos venenos através dos tecidos do indivíduo afetado (SANTOS PINTO et. al., 2012). Bookbinder et al. (2006) demonstraram que a hialuronidase humana aumentou em até 20 vezes a taxa de infusão e penetração de moléculas de até 200 nm de diâmetro pela clivagem do ácido hialurônico. Essa propriedade vem sendo explorada em diversos campos da medicina, visando utilizá-la como adjuvante para aumentar a absorção e dispersão de drogas injetáveis (DUNN et al., 2010), aumentar a efetividade de anestésias e do efeito analgésico local em cirurgias (BUHREN et al., 2016), reduzir edemas por sua ação conjunta em procedimentos para alívio de dores crônicas (JOHANSSON et al., 1999; DUNN et al., 2010; FAVORITO et al., 2012) e como agente promotor de cicatrização em lesões na pele (FRONZA et al., 2014; BORDON et al., 2015). Além disso, a administração de hialuronidase bovina em camundongos xenoenxertados para o desenvolvimento de câncer de mama demonstrou a desestruturação do ácido hialurônico e a rápida redução no tamanho do tumor (SHUSTER et al., 2002; KHAN et al., 2018). Em outro estudo com hialuronidase de artrópodes, isolada do veneno de escorpião *Buthus martensi*, foi observada a redução da expressão de CD44 variante 6 na linha celular do câncer de mama MDA-MB-231

(FENG et. Al., 2010). O receptor CD44 é o sítio de ligação do ácido hialurônico e, sua interação junto ao citoesqueleto inicia as vias de transdução de sinais que induzem o crescimento do câncer (BOURGUIGNON et al., 2000; KHAN et al., 2018). Em um estudo recente, a administração de hialuronidase humana (rHuPH20) em ratos com bursite retrocalcanea induzida demonstrou o aumento na capacidade de cicatrização do tendão, através da remoção do ácido hialurônico e sulfato de dermatan que se acumulam no local (REZVANI et al., 2020). Esses resultados demonstram o potencial biotecnológico da enzima e a importância de seu estudo para aplicação em terapias e desenvolvimento de fármacos à base de hialuronidase (BORDON et. al., 2015).

A hialuronidase do veneno da *Polybia paulista*, uma vespa neotropical clinicamente relevante pertencente ao grupo Hymenoptera sub-família *Polistinae* da tribo Epiponini (GUIMARÃES, 2009; OLIVEIRA; SOUZA; PIRES, 2017; PEREZ-RIVEROL et al., 2017), tem sido usado em terapias e se mostra como um potencial candidato para a produção de novos fármacos (PEREZ-RIVEROL et al., 2017). Além do uso do veneno de *P. paulista* em diagnóstico resolvido em nível de componente (do inglês, *Component-Resolved Diagnosis* – CRD) ele apresenta ação anti-tumoral devido à atividade citotóxica e antiproliferativa seletiva do peptídeo Polybia-MPI, contra células de câncer de próstata e bexiga (PEREZ-RIVEROL et al., 2017; WANG et al., 2008). Entretanto, a HIAL nativa é encontrada em pequenas quantidades (PEREZ-RIVEROL; PALMA; JAKOB, 2020) o que dificulta seu isolamento, purificação e consequentemente sua utilização em fins biotecnológicos. Diante disso, a sua produção na forma recombinante, em sistemas de expressão heteróloga, tem sido usada como alternativa viável.

A expressão de proteínas heterólogas tem sido realizada por meio de clonagem em sistemas procariotos (*Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*); eucariotos (fungos filamentosos, leveduras, células de mamíferos e insetos); plantas e animais transgênicos (BORGES, 2015; GOPAL; KUMAR, 2013). A clonagem e expressão heteróloga de Poly p 2 (hialuronidase do veneno de *P. paulista*) em levedura *Komagataella phaffi* (anteriormente denominada *Pichia pastoris*) resultou em expressão solúvel e ativa da enzima, mas infelizmente com muito baixos níveis de recuperação da proteína, conforme já observado por nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Molecular de Artrópodes-LBMA do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, SP, independente dos vários esforços realizados para melhorar sua recuperação.

Tendo em vista que entre todos os sistemas de expressão, a *Escherichia coli* tem sido o mais utilizado devido ao baixo custo de cultivo, ciclo de vida curto, produção de proteínas em grande quantidade e facilidade de manipulação genética devido a sua estrutura molecular bem conhecida (SCHWAIGHOFER et al., 2020, GOPAL; KUMAR, 2013; PEREIRA, 2009), a Poly p 2 passou a ser produzida neste sistema. Porém, devido à falta de um maquinário pós-traducional, a expressão proteica em *E. coli*, na maioria dos casos e, principalmente envolvendo proteínas de alta massa molecular, leva à produção de proteínas insolúveis e inativas (SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2008), o que torna necessária a recuperação destas proteínas a partir dos corpos de inclusão bacterianos, onde elas se acumulam. Para isso, quatro etapas devem ser realizadas: isolamento dos corpos de inclusão das células de *E.coli*; solubilização dos agregados proteicos; reenovelamento (*refolding*) e purificação das proteínas solubilizadas (GARCIA, 2012; VALLEJO; RINAS, 2004). As etapas de solubilização e *refolding* são cruciais para obtenção das proteínas bioativas (REGATIERI, 2014; SINGH; PANDA, 2005).

Apesar das vantagens associadas à formação dos corpos de inclusão bacterianos como fácil isolamento, baixos níveis de degradação da proteína expressa, resistência a ação de proteases celulares e poucos contaminantes (SINGH; PANDA, 2005), ao submeter as proteínas insolúveis ao processo de *refolding* uma fração delas é perdida. Para superar a barreira da insolubilidade, a expressão em baixas temperaturas parece fornecer o tempo necessário para o correto dobramento do polipeptídeo recém-formado (SONG et al., 2012) produzindo, dessa forma, proteínas em condições solúveis, dispensando a necessidade de procedimentos posteriores para recuperação de sua atividade biológica e função.

Portanto, no presente trabalho propusemos otimizar a expressão da proteína rPoly p 2 (forma recombinante de Poly p 2 expressa em *E. coli*) em baixas temperaturas de modo que a maior porção das proteínas sejam produzidas em sua forma solúvel. Além disso, as proteínas produzidas na forma de corpos de inclusão foram submetidas ao processo de *refolding*, em condições de tampão, pH e aditivos previamente padronizados pelo nosso grupo. As proteínas recuperadas pós-reenovelamento, foram submetidas a dosagem dos níveis de atividade enzimática em solução e paralelamente comparadas às atividades de nPoly p 2 (hialuronidase nativa, presente no veneno bruto de *P. paulista* e à ryPoly p 2 (hialuronidase na forma recombinante, expressa em *Komagataella phaffii*) para validação dos resultados em

termos de níveis de atividade. Estes resultados são importantes no sentido de viabilizar uma maior produção dessa proteína a custos mais acessíveis com finalidade de sua futura utilização em processos biotecnológicos, tais como na inibição da fibrose hepática e na apoptose de células cancerígenas.

2.OBJETIVO

O principal objetivo deste trabalho foi a obtenção da enzima rPoly p 2 ativa e em quantidades suficientes para ser utilizada em fins biotecnológicos. Para tanto, foram avaliados:

- os efeitos da expressão de rPoly p 2 em *E. coli* sob condições de baixas temperaturas (8, 10, 12° C) visando a produção adequada dessa proteína na sua forma solúvel e ativa.
- a submissão das proteínas produzidas na fase insolúvel ao processo de *refolding* visando a recuperação de sua atividade.

2.1 Objetivos específicos

- Expressão da proteína hialuronidase (Poly p 2) em *E. coli* sob condições de baixas temperaturas.
- Reenovelamento da proteína produzida na fase insolúvel (corpos de inclusão bacterianos)
- Avaliação e comparação da atividade enzimática da rPoly p 2 com os níveis de atividade de seu homólogo presente no veneno bruto de *P. paulista*, da hialuronidase expressa em sistema eucarioto *Komagataella phaffii*.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Expressão da rPoly p 2 (hialuronidase de *P. paulista* expressada em *E. coli*)

A partir de clones recombinantes de *E. coli* BL21 DE3 contendo o vetor pET28a-*poly p 2* (correspondente à sequência de cDNA codificante da enzima hialuronidase do veneno de *P. paulista*), colônias isoladas, crescidas em meio Luria Broth (LB) sólido contendo 40 ug/mL de canamicina, foram inoculadas em 5 mL de meio LB (Lurian B) líquido suplementado com canamicina (50 ug/mL) e incubado por 16h a 37°C para permitir o crescimento das células até DO600nm = 0,3-0,5. Este pré inóculo foi

adicionado em 100 mL de meio LB com canamicina (30 µg/mL) e, incubado por cerca de 1h30 até a leitura da DO_{600nm} = 0,4-0,6 ser atingida. Em seguida, 100 µL de β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Invitrogen, EUA) foram adicionados para a indução da expressão, a qual foi realizada sob as temperaturas de 8, 10 e 12°C por 48 horas, em triplicatas para cada temperatura. Após o término do período de expressão em cada temperatura, as amostras foram centrifugadas e o precipitado e sobrenadante foram separados. Alíquotas do sobrenadante de cada temperatura foram coletadas para análise em gel SDS-PAGE.

3.2 Ruptura celular e solubilização do precipitado de rPoly p 2

As células oriundas do precipitado do meio de cultura e lavadas em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.0 e NaCl 150 mM foram submetidas ao sonificador “SONICS VibraCell™” (7 ciclos de 1 min) em gelo e para a ruptura celular e liberação de proteínas dos corpos de inclusão bacterianos. Após centrifugação, a porção insolúvel foi ressuspenso em tampão de solubilização (Tris/HCl 20 mM pH 7 contendo NaCl 150 mM, Uréia 8 M, Imidazol 20 mM) e incubada em plataforma de agitação por 4 horas em temperatura ambiente, enquanto que as porções solúveis (sobrenadantes das expressões) foram armazenadas a -20°C para as análises seguintes. Uma fração de cada amostra - solúvel e solubilizada - expressa a 8 °C, 10 °C e 12 °C foi também separada para análise em SDS-PAGE 12%.

3.3 Purificação de rPoly p 2 – Sobrenadante e solubilizado

As amostras dos sobrenadantes e dos precipitados solubilizados de 8 °C, 10 °C e 12 °C foram individualmente submetidas à filtração em membranas (Standard MF-Milipore Membranes) de 0,45 µm e 0,22 µm para remoção de impurezas. Em seguida, foram individualmente concentradas utilizando filtros Amicon (Ultra-15 Centrifugal Filter Units) de 10 kDa, sendo as amostras de sobrenadante e dos solubilizados ressuspendidas em seus devidos tampões de equilíbrio: (i) tampão de equilíbrio sobrenadante - Tris/HCl 20 mM pH 7 contendo NaCl 150 mM e Imidazol 20 mM; tampão de equilíbrio dos solubilizados (ii) - Tris/HCl 20 mM pH 7 contendo NaCl 150 mM, Uréia 8 M e Imidazol 20 mM.

A purificação de rPoly p 2 foi feita por cromatografia de afinidade em resina de Ni²⁺ (Ni-NTA-Agarose) seguindo o protocolo do fabricante (Protocol 14. The

QIAexpressionist. Qiagen. Germany) utilizando para os sobrenadantes o tampão de Tris/HCl 20 mM pH 7 contendo NaCl 150 mM e, para os solubilizados tampão de Tris/HCl 20 mM pH 7 contendo NaCl 150 mM e Uréia 8 M. Em ambos os casos, as colunas foram lavadas e eluídas com seus respectivos tampões contendo concentrações crescentes de imidazol.

Especificamente, as resinas de Ni^{2+} individuais para cada amostra foram lavadas com 10 mL de água MiliQ e equilibradas com tampão de equilíbrio presente nas amostras. Em seguida 1 mL de resina foi individualmente misturada a 10 mL de amostras em um tubo falcon de 50 mL e incubadas overnight na geladeira a 4 °C. No dia seguinte, as amostras+resinas foram transferidas para minicolunas descartáveis de 5 mL para a retirada do excesso de tampão e, então a resina foi lavada duas vezes com os tampões correspondentes de cada amostra antes da eluição da enzima. A primeira e segunda lavagem foram feitas com o tampão contendo 20 mM e 50 mM de imidazol, respectivamente, enquanto que a eluição da rPoly p 2 foi feita com o tampão de concentração de 200 mM de imidazol. Devido aos baixos níveis de proteína obtidos após a purificação da proteína expressa em todos os casos, as amostras foram novamente concentradas em filtros Amicon (Ultra-15 Centrifugal Filter Units) de 10 kDa e resuspendidas em 1 mL de Tampão de eluição e uma fração dessas foi separada para análise em SDS-PAGE 12%.

3.4 Reenovelamento (*Refolding*)

O refolding foi feito segundo a metodologia descrita por Skov. et. al. (2006) com adaptações nos tampões usados. Alíquotas de rPoly p 2 solubilizadas foram adicionados à membrana de celulose SIGMA acoplada a presilhas apropriadas para diálise e então fixadas a um bequer de 600 mL. Ao bequer foram adicionados 500 mL do tampão de reenovelamento (Tris-HCl 50 mM pH 7.0, glutatona oxidada 0,01 mM, glicerol 1% e EDTA 3 mM) que foram submetidos à agitação leve a 4 °C por um período total de 4 horas, sendo feitas trocas do tampão a cada 1 hora. Assim, ao fim do período de diálise foram feitas três trocas, sendo que, no final as amostras foram armazenadas a -20 °C para análises posteriores.

3.5 Expressão de ryPoly p 2 em *Komagataela phaffii* (*Pichia pastoris*)

Para a expressão da proteína em levedura, células de *Komagataela phaffii* X-33/pPICZαA contendo a sequência de cDNA de Poly p 2 de *P. paulista* foram crescidas em meio YPD-ágar *Yeast Extract peptone Dextrose* – (extrato de levedura a 1%, peptona a 2% dextrose (glicose) a 2%, ágar e Zeomicina a 100ug/mL), a 28 °C por cinco dias (120h). A partir de uma colônia isolada de levedura foi feito um pré-inóculo em 25mL de meio BMGY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, 100 mM de KPO₄ pH 6.0, YNB a 1.34%, biotina a 4x10⁻⁵% *overnight* a 28 °C com agitação de 250 rpm.

Após o período de pré-inóculo, alíquotas (diluídas ou não) destas células foram submetidas à leitura da DO_{600nm} e assim, foi calculado um volume necessário dessas células para apresentarem DO_{600nm} = 1,0 em 100mL de cultura em meio de expressão. A seguir, o volume necessário foi submetido à centrifugação a 3.000 g por 5 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas três vezes com 25 mL de H₂O MiliQ estéril. Após as lavagens as células foram ressuspensas em meio de expressão BMMY (extrato de levedura a 1%, peptona a 2%, KPO₄ pH 6.0 a 100 mM, YNB a 1.34%, biotina a 4x10⁻⁵ %) e transferidas para um Erlenmeyer de 1000 mL com um total de 100 mL de meio BMMY. Para a indução da expressão de ryPoly p 2, foram adicionados ao meio 1mL do indutor metanol a cada 24 horas por 120 horas e incubadas a 250 rpm a 28 °C. Antes da primeira indução e após cada uma das induções seguintes foram coletadas alíquotas de 1 mL para análise em gel SDS-page.

3.6 Purificação de ryPoly p 2 (hialuronidase de *P. paulista* expressada em *K. phaffii*)

Primeiramente o meio BMMY foi centrifugado por 5 minutos a 4000g para a separação das células da levedura do sobrenadante contendo a proteína expressa. Então o sobrenadante foi filtrado em membranas (Standard MF-Milipore Membranes) de 0,45 µm e 0,22 µm para remoção das células mortas e outras impurezas. O conteúdo filtrado foi ressuspensado em filtros Amicon (Ultra-15 Centrifugal Filter Units) de 10 kDa e em 10 mL de tampão NaPO₄ 20 mM pH 7.4 contendo NaCl 0,5 M e Imidazol 20 mM. A purificação de ryPoly p 2 foi feita por cromatografia de afinidade em resina de Ni²⁺ (Ni-NTA-Agarose) seguindo o protocolo do fabricante (Protocol 14. The QIAexpressionist. Qiagen. Germany) conforme descrito no item 3.3, porém os tampões foram substituídos. Desta forma, para o equilíbrio e primeira lavagem da

coluna foi usado o tampão NaPO₄ 20 mM pH 7.4 contendo NaCl 0,5 M e Imidazol 20 mM, já para a segunda etapa de lavagem e eluição da ryPoly p 2 esse mesmo tampão foi usado mas com as concentrações de 50 mM e 200 mM de imidazol, respectivamente. Uma fração da amostra purificada foi separada para análise em gel SDS-PAGE 12%.

3.7 Atividade enzimática de Poly p 2 nas formas nativa (nPoly p 2, no veneno bruto de *P. paulista*) e recombinante expressa em *E. coli* (r Poly p 2) e em *K. phaffii* (ry Poly p 2)

O ensaio de atividade enzimática de Poly p 2 feito através do método turbidimétrico descrito por (LONG-ROWE; BURNETT, 1994) e modificado por Silva et al (2004), utilizando sulfato de condroitina como substrato. Para as reações, foram utilizados cerca de 10 a 200µL das amostras (extrato de veneno bruto de *P. paulista* e a enzima expressa em *K. phaffii* usados como controle positivo e, os tratamentos contendo a enzima na forma solúvel ou reenovelada), as quais, foram incubadas por 1 hora a 37 °C em um volume final de 1mL contendo tampão de acetato de sódio pH 5.2 100 mM, NaCl 0.15 M e sulfato de condroitina 0.05 mg/mL. As reações foram interrompidas pela adição de 500 µl da solução de CTBA (CTBA 2,5%, NaOH 2%). As misturas finais (1,5 mL) foram deixadas à temperatura ambiente por 10 minutos para permitir o desenvolvimento da turbidez e, em seguida foi lida a sua absorbância em 400 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de hialuronidase necessária para a hidrólise de 1nanograma de sulfato de condroitina a 37 °C por 1 hora. O mesmo procedimento foi feito para as enzimas expressas em *K. phafii* e com veneno bruto de *P. paulista* usados como controle positivo.

3.8 Análises estatísticas

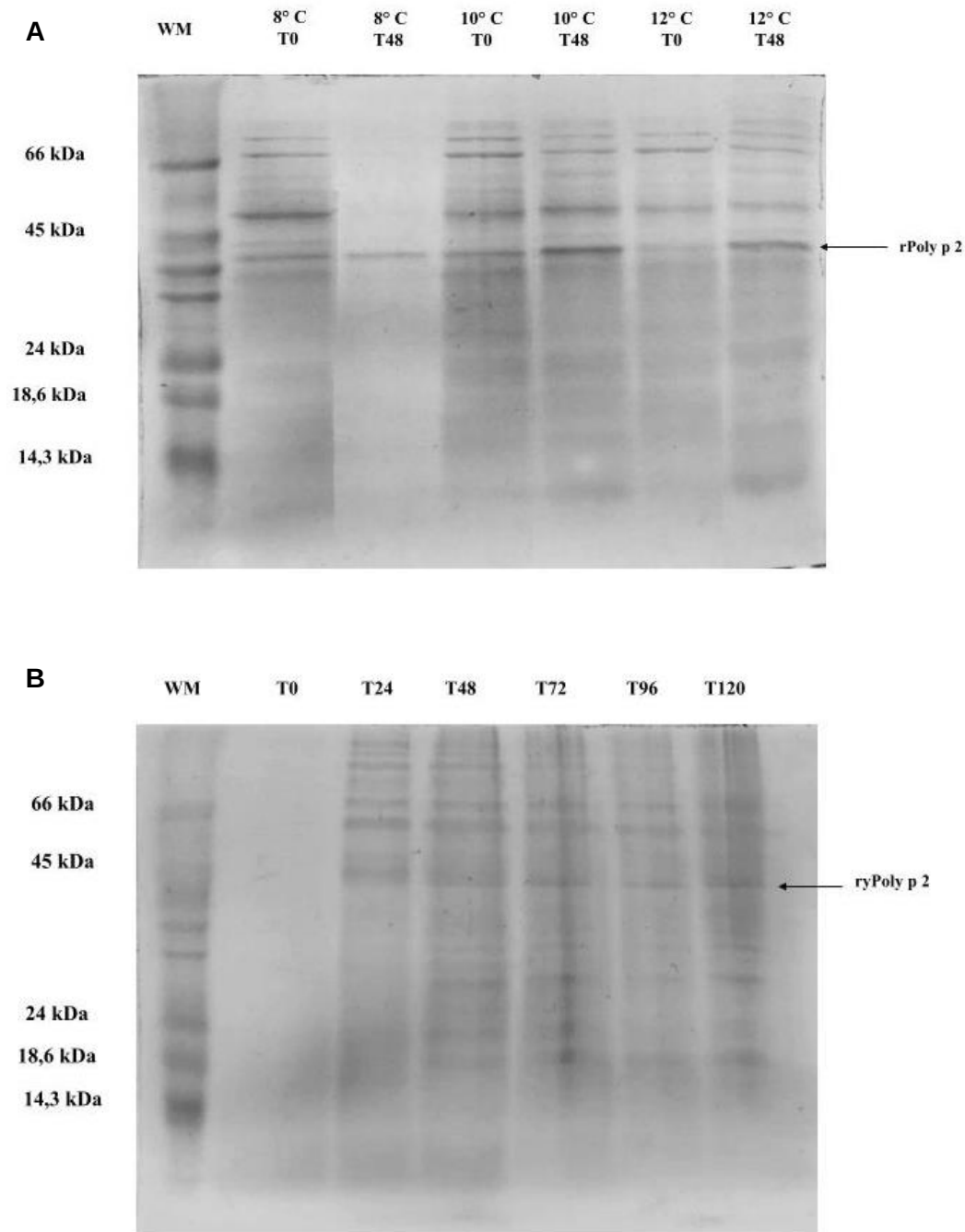
As análises estatísticas dos resultados foram feitas através do programa Graph Pad versão 7.0 (Prism Inc.), adotando valor p<0.05 de significância estatística, para os cálculos de variância simples (ANOVA one-way) e teste post-hoc de Dunnet, de maneira distinta entre os grupo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão de rPoly p 2 na forma recombinante em *E. coli* e *K. phaffii*

A enzima hialuronidase da vespa *Polybia paulista* na forma recombinante (rPoly p 2) foi expressa a partir de clones de culturas de *E. coli* sob as temperaturas de 8 °C, 10 °C e 12 °C por 48 horas e também em células de levedura *K. phaffii* (ryPoly p 2) a 28 °C por 120h (**Figura 1 A-B**). Uma vez que os volumes dos respectivos meios de cultura utilizados para a expressão em ambos sistemas foi o mesmo (100mL), é possível se observar uma maior produção da enzima no sistema procarioto em sua porção solúvel (no sobrenadante da cultura) em temperaturas mais baixas (**Figura 1 A**), sendo que na temperatura de 10°C no tempo de 48 horas foi possível observar uma maior produtividade da proteína solúvel (rPoly p 2, de 39kDa) quando comparada com as temperaturas de 8 e 12°C. Conforme há um aumento da temperatura de expressão, começa a ocorrer uma maior velocidade síntese proteica, levando a um certo acúmulo da proteína e adicionalmente, não há tempo suficiente para permitir o enovelamento mais apropriado para a proteína, fazendo com que ela fique inativa formando agregados que se precipitam no citoplasma bacteriano, na forma de corpos de inclusão. Em temperaturas mais baixas, a redução resultante na taxa de síntese de proteínas, pode simplesmente tanto fornecer mais tempo para o dobramento adequado da cadeia nascente, como também, pode induzir proteínas de choque frio que auxiliam no enovelamento (GELLISSEN, 2005).

Figura 1 (A,B). Expressão recombinante comparativa de Poly p 2 nos sistemas eucariótico (*E. coli*) e de levedura (*K. phaffii*). Perfil em SDS-PAGE a 12% da enzima hialuronidase na sua forma recombinante expressa em 100 mL de meio de cultura específico para cada sistema. **A** – Expressão de rPoly p 2 em *E. coli* de 0h (T0) a 48h (T48), nas temperaturas de 8, 10 e 12 °C. WM: marcador de massa molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Markert – PROMEGA – 608-274-4330). **B** – Expressão de ryPoly p 2 em *K. phaffii* de 0h (T0) a 120h (T120) em 28 °C. WM: marcador de massa molecular (o mesmo acima).



No sistema de levedura (*K. phaffii*), o tempo necessário para ocorrer a síntese induzida da proteína de interesse é bem maior e em muitos casos pode resultar em um nível significativo da proteína recombinante, o que não se verifica com a enzima Poly p 2 cujos níveis produzidos da proteína solúvel são bem baixos, como se pode observar na **Figura 1-B** acima com 120 h de expressão.

Os dados da **Figura 1-A** são importantes porque além de demonstrarem a viabilidade do uso do sistema procarioto na produção dessa enzima em sua forma solúvel, indicam que se a proteína rPoly p 2 pode ser também produzida na forma ativa, principalmente sob a condição de 10 °C, uma significativa economia nos custos de purificação desta proteína pode ser alcançada, o que é extremamente relevante em termos biotecnológicos. Por outro lado, verificamos que o aumento de apenas 2 graus na temperatura de expressão resultou em uma menor produtividade de rPoly p 2 solúvel. Conforme demonstrado por (VERA et al., 2007) sob condições mais elevadas de expressão, 37 °C e 30 °C, a *E. coli* produziu 58.8% e 54.4% de proteínas recombinantes na sua porção insolúvel, enquanto em expressão sob 16 °C apenas 16.9% das proteínas se formaram como corpos de inclusão.

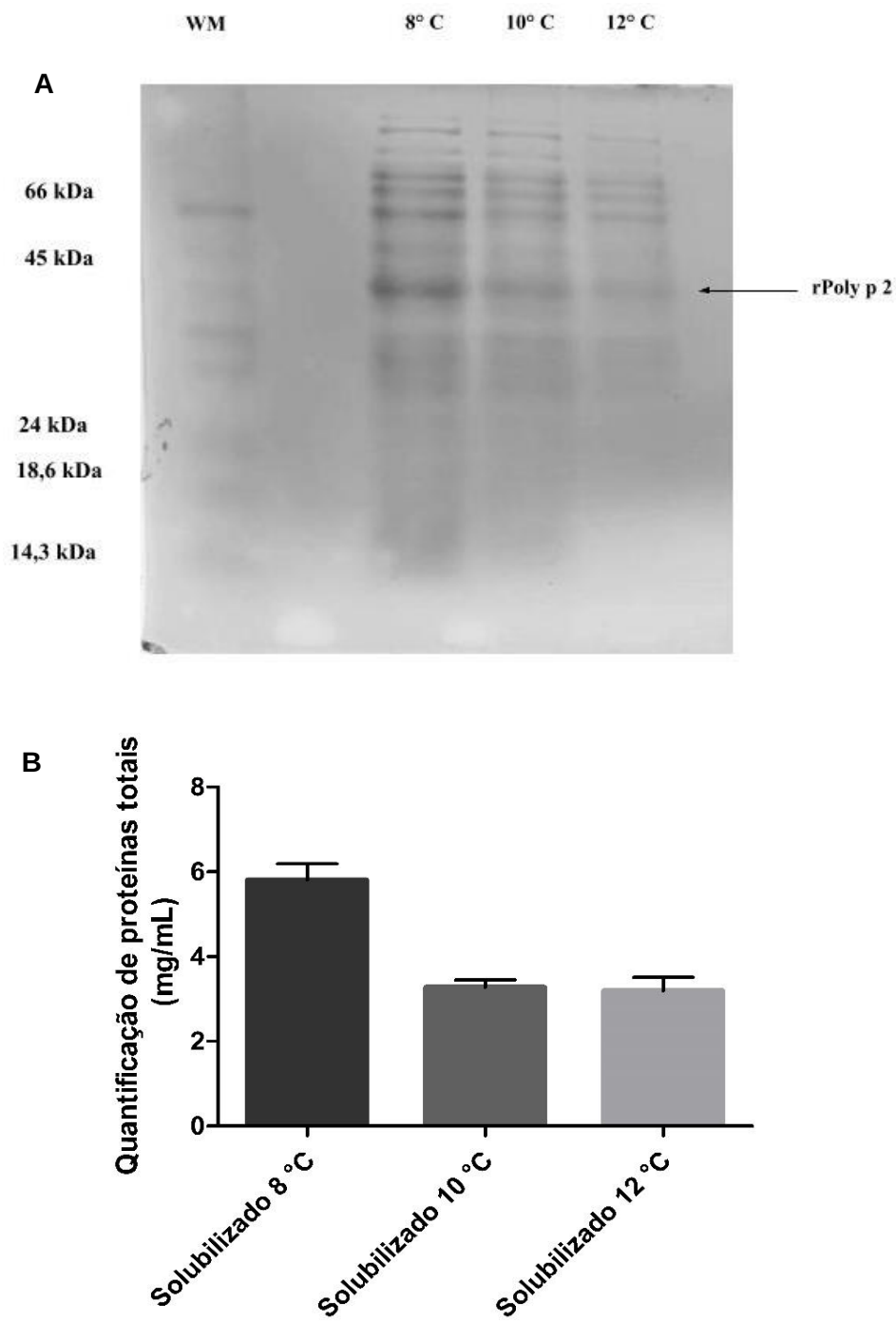
4.2 Solubilização dos corpúsculos de inclusão contendo rPoly p 2

Após centrifugação das culturas e retirada do meio de expressão, as células de *E. coli* foram submetidas a ruptura celular para liberação da proteína que ficou retida nos corpos de inclusão e então solubilizada. O processo de solubilização que utiliza altas concentrações de agentes caotrópicos, como a uréia, age desfazendo os agregados proteicos, mas leva à perda da estrutura secundária da proteína (SINGH; PANDA, 2005), necessária para o correto reenovelamento da enzima. Por este motivo, há necessidade de que em seguida à solubilização seja realizado um processo de *refolding*, na presença de agentes protetores e oxidantes que propiciem a minimização de proteólise e a formação de pontes dissulfeto.

Os resultados mostraram que a expressão e solubilização da enzima foi melhor na condição de expressão de 8°C com recuperação de 5.81 mg/mL de proteínas totais, enquanto nas condições de expressão de 10 °C e 12 °C os níveis de proteínas totais dosados foram menores, 3.27 mg/mL e 3.19 mg/mL, respectivamente (**Figura 2 A-B**). É importante salientar que as baixas intensidades das bandas visualizadas em gel, bem como os reduzidos níveis de dosagem de proteínas totais vistos sob as

condições de 10 °C podem ser relacionados com a maior intensidade de proteínas produzidas na fração solúvel sob esta mesma condição (**Figura 1 A**).

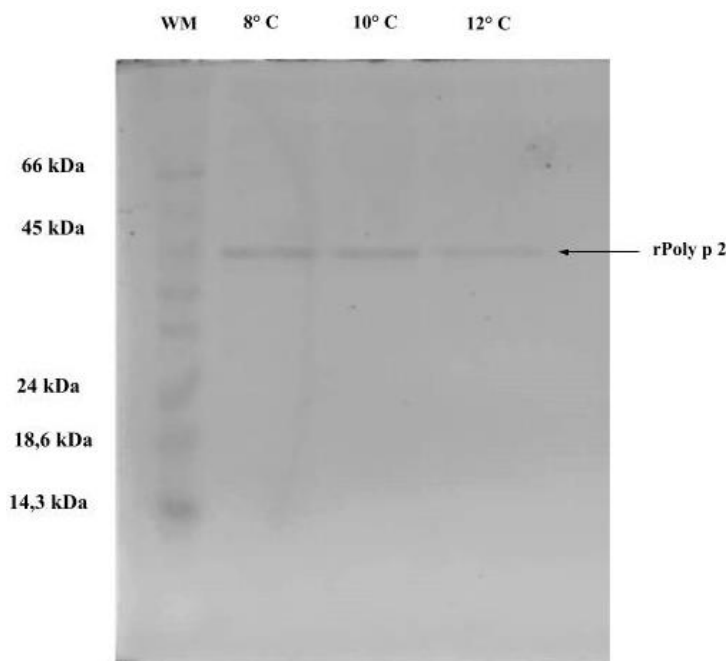
Figura 2 A – Níveis de recuperação de rPoly p 2 após os processos de solubilização e *refolding*. (**A**) Perfil em SDS-PAGE a 12% da enzima rPoly p 2 expressa sob temperaturas de 8 °C, 10 °C e 12 °C em corpos de inclusão e submetidas a solubilização (**B**) Quantificação de proteínas totais solubilizadas (mg/mL) – rPoly p 2 (hialuronidase do veneno de *Polybia paulista* expressas em *E. coli* sob temperaturas de 8°C, 10°C e 12°C.



4.3 Purificação da rPoly p 2 (sobrenadante e solubilizado) e ryPoly p 2

O sobrenadante da expressão de ambos os sistemas – de *E. coli* e (*K. phaffii* - bem como as amostras contendo a enzima solubilizada, foram submetidas a purificação. A rPoly p 2 purificada a partir das frações solubilizadas apresentou níveis de recuperação satisfatórios em todos os tratamentos, tendo um melhor grau de purificação nas frações expressas nas temperaturas mais baixas, 8°C e 10°C (**Figura 3**).

Figura 3 – Análise comparativa dos níveis de solubilização dos corpos de inclusão provenientes das expressões em diferentes temperaturas. Perfil em SDS-PAGE 12% da enzima rPoly p 2 purificada dos solubilizados dos corpos de inclusão por cromatografia de afinidade em resina de Ni^{2+} (Ni-NTA-Agarose), eluídas em tampão de Tris/HCl 20 mM pH 7.0 contendo NaCl 150 mM, Imidazol 200 mM e Uréia 8 M. WM: marcador (Broad Range Protein Molecular Weight Marker- PROMEGA- 608-274-4330); 8 °C; 10 °C e 12 °C, indicam respectivamente as amostras de corpos de inclusão provenientes das expressões nestas temperaturas.



Por outro lado, a rPoly p 2, obtida das porções solúveis, apresentou níveis extremamente baixos e difíceis de serem visualizados mesmo após coloração do gel SDS-PAGE 12% com nitrato de prata. Contudo, por meio de dosagem proteica destas amostras com reagente Bradford foi possível detectar níveis de 0.360 mg/mL, 0.279 mg/mL e 0.387 mg/mL para 8 °C, 10 °C e 12°C, respectivamente mas com volumes insuficientes para outras análises (**Figura 4 A-B**). Os resultados da purificação da

ryPoly p 2 expressa no sistema eucarioto (*K. phaffii*) também puderam ser visualizadas em gel SDS-PAGE 12%, conforme pode ser visualizado na **Figura 5**.

Figura 4 A-B – Intensidade de bandas e níveis de proteínas totais observados para a rPoly p 2 obtidas das frações solúveis, após purificação em resina de afinidade. **(A)** Perfil em SDS-PAGE 12% corado com nitrato de prata da enzima rPoly p 2 do sobrenadante, purificada por cromatografia de afinidade em resina de Ni^{2+} (Ni-NTA-Agarose) e eluída em tampão de Tris/HCl 20 mM pH 7.0 contendo NaCl 150 mM, Imidazol 200 mM e Uréia 8 M. WM: marcador (Broad Range Protein Molecular Weight Marker- PROMEGA- 608-274-4330); 8 °C, 10 °C e 12 °C correspondem aos sobrenadantes das células crescidas nestas temperaturas. **(B)** Quantificação de proteínas solúveis após purificação (mg/mL) – rPoly p 2 (hialuronidase do veneno de *Polybia paulista* expressa em *E. coli* sob temperaturas de 8°C, 10°C e 12°C.

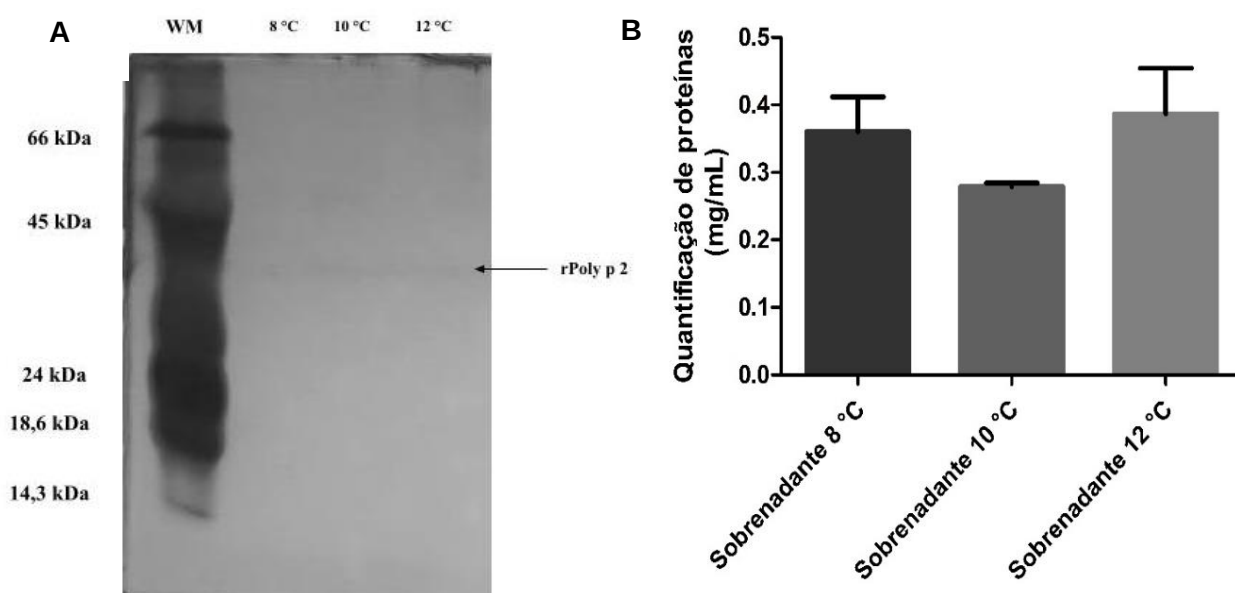
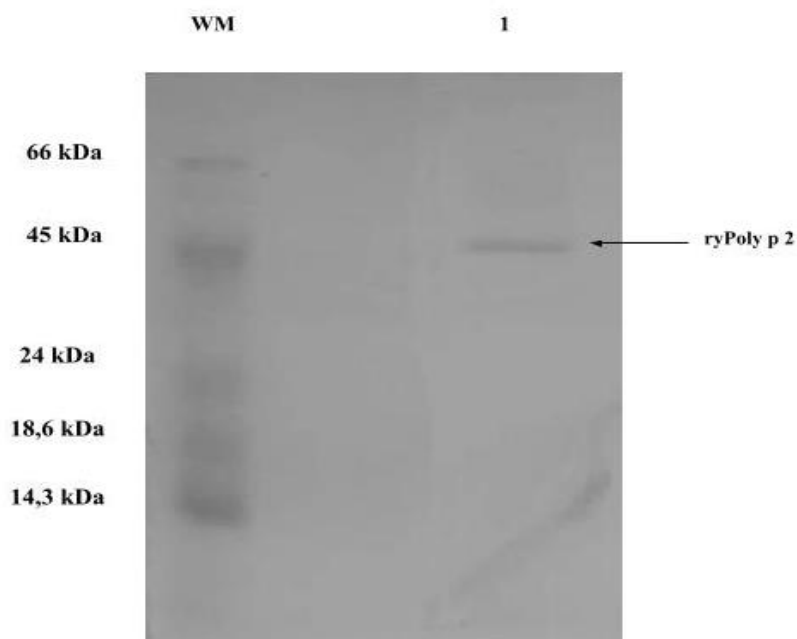


Figura 5 – Intensidade de banda observada para a enzima ryPoly p 2 expressa em *K. phaffii*, após purificação em cromatografia de afinidade. Perfil em SDS-PAGE 12% da enzima ryPoly p 2 purificada por cromatografia de afinidade em resina de Ni^{2+} (Ni-NTA-Agarose), eluída em tampão de NaPO_4 0,2 M pH 7.4 contendo NaCl 0,5 M e Imidazol 200 mM.



4.4 Atividade enzimática de hialuronidase

Após a devida purificação e reenovelamento (*refolding*) as amostras de rPoly p 2 foram submetidas à dosagem de atividade enzimática, realizada em triplicata. Todas as amostras dos sobrenadantes (porções solúveis) e do reelovelamento, assim como, a amostra de ryPoly p 2, utilizada como controle positivo apresentaram baixos níveis de atividade quando comparadas ao extrato de veneno bruto de *P. paulista* (**Figura 6 e Tabela 1**).

Figura 6 – Análise comparativa dos níveis de atividade específica (U/mg) obtidos para a Poly p 2 nas formas recombinantes e nativa nos diferentes tratamentos. Atividade enzimática da rPoly p 2 sobrenadante das células e *refolding* de 8 °C, 10 °C e 12 °C utilizando a proteína expressa em *K. phaffii* e o veneno bruto de *P. paulista* como controles positivos. *U = nomenclatura de sulfato de condroitina hidrolisados/min, sob as condições de reação indicadas.

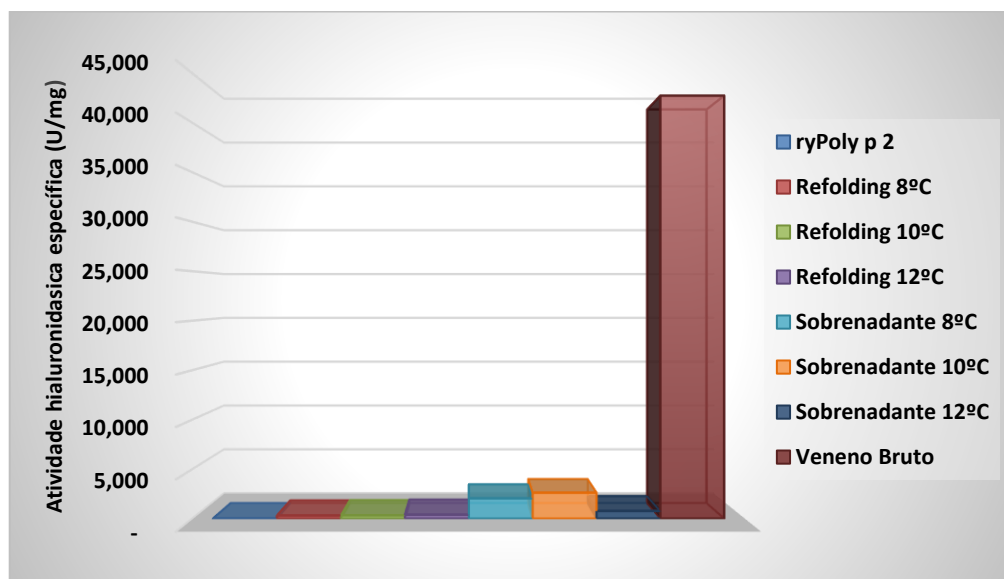


Tabela 1- Análise comparativa dos níveis de proteínas totais, atividade total (U/mL) e específica (U/mg) obtidos para a rPoly p 2 (hialuronidase recombinante expressa em *E. coli*), sobrenadante e *refolding* de 8 °C, 10 °C e 12 °C, ryPoly p 2 (hialuronidase recombinante expressa em *K. phaffii*) e no veneno bruto de *P. paulista*.

	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade enzimática total (U/mL)	Atividade enzimática específica (U/mg)
Sobrenadante 8 °C	0.360	740.60	2057.22
Sobrenadante 10 °C	0.279	732.01	2623.70
Sobrenadante 12 °C	0.387	301.61	779.37
Refolding 8 °C	0.506	159.93	316.06
Refolding 10 °C	0.555	184.61	332.64
Refolding 12 °C	0.476	192.13	403.63
ryPoly p 2	0.662	184.61	278.87
Veneno bruto	0.622	26581.10	42734.89

*U = nanomoles de sulfato de condroitina hidrolisados/min, sob as condições de reação indicadas.

Por meio da **Figura 6 Tabela 1** denota-se que a rPoly p 2 proveniente das frações solúveis (sobrenadante das células) apresentou níveis significativos de atividade enzimática quando comparada à mesma enzima rPoly p 2, proveniente dos processos de reenovelamento e ao controle positivo ryPoly p 2 expresso em levedura (**Figura 7**). Entre os sobrenadantes, o maior nível de atividade enzimática específica foi observado pela condição de 10 °C seguida por 8 °C e 12 °C com 2623.70, 2057.22 e 779.37 nmoles de sulfato de condroitina hidrolisados/min.mg (U/mg), respectivamente. Esses resultados corroboram com trabalhos realizados por (SONG, et al. 2012) onde foram demonstrados elevados níveis de atividade em proteínas expressas a 10 °C em *E. coli*, sem prévia adaptação para a expressão sob baixas temperaturas. No caso da rPoly p 2 proveniente dos tratamentos de reenovelamento, os maiores níveis de atividade enzimática foram observados sob a condição de expressão a 12 °C, seguido por 10 °C e 8 °C com média de 403.63, 332.64 e 316.06 nmoles de sulfato de condroitina hidrolisado/min.mg (U/mg), respectivamente. Entretanto, nenhum dos tratamentos conseguiu atingir os níveis de atividade observados para a enzima no extrato de veneno bruto de *P.paulista*, o que indica que mais estudos devem ser conduzidos para se otimizar a produção recombinante desta enzima para fins biotecnológicos.

De todo modo, estes resultados, foram muito importantes porque indicam a possibilidade de obtenção da proteína rPoly p 2 na forma solúvel e ativa quando expressa em *E. coli* a 10°C, mas ainda não com altos níveis de atividade específica. Assim, experimentos futuros poderão ser realizados no sentido de incrementar estes dados. Por outro lado, se a proteína rPoly p 2 pode ser produzida na forma solúvel e ativa, principalmente sob a condição de 10 °C, uma significativa economia nos custos de purificação desta proteína poderá ser alcançada, o que é extremamente relevante em termos biotecnológicos.

4. CONCLUSÕES

1. Os experimentos de expressão heteróloga de rPoly p 2 em *E. coli* à baixa temperatura -8°C, 10°C e 12°C- indicaram a possibilidade de obtenção da enzima ativa e na forma solúvel, apresentando maior intensidade de banda no extrato da expressão e nível de atividade enzimática no sobrenadante das células, quando expressa a 10°C por 48h.

2. Os tratamentos de solubilização dos corpos de inclusão e reenovelamento, não foram eficientes para a recuperação da enzima sob as condições aqui testadas.

3. A avaliação e comparação dos níveis de atividade enzimática entre os tratamentos demonstrou níveis significativos de atividade da rPoly p 2 proveniente das frações solúveis (sobrenadante das células) em relação aos obtido nos processos de reenovelamento e do controle positivo (ryPoly p 2) expresso em levedura. No entanto, nenhum dos tratamentos atingiu os níveis de atividade hialuronidásica observado no extrato de veneno bruto de *P. paulista*.

4. Os resultados descritos indicam a possibilidade de obtenção da proteína rPoly p 2 na forma solúvel e ativa quando expressa em *E. coli* a 10°C, um resultado relevante em termos biotecnológicos

5. REFERÊNCIAS

- AMORIM, F. G.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; BORDON, K. de C. F.; CARDOSO, I. A.; PAUW, E. De; QUINTON, L.; KASHIMA, S.; ARANTES, E. C. Heterologous expression of rTsHyal-1: the first recombinant hyaluronidase of scorpion venom produced in *Pichia pastoris* system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 3145–3158, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8821-z>
- BOOKBINDER, L. H.; HOFER, A.; HALLER, M. F.; ZEPEDA, M. L.; KELLER, G.; LIM, J. E.; EDGINGTON, T.; SHEPARD, H.; PATTON, J. S.; FROST, G. I. A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics. **Journal of controlled release**, v. 114, n. 2, p. 230–241, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.05.027>
- BORDON, K. C. F.; WIEZEL, G. A.; AMORIM, F. G.; ARANTES, E. C. Arthropod venom Hyaluronidases: biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, n. 43, p. 1–12, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s40409-015-0042-7>
- BOURGUIGNON, L. Y. W.; ZHU, H.; SHAO, L.; CHEN, Y. W. CD44 Interaction with Tiam1 Promotes Rac1 Signaling and Hyaluronic Acid-mediated Breast Tumor Cell Migration. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 3, p. 1829–1838, 2000.
- BUHREN, B. A.; SCHRUMPF, H.; HOFF, N. P.; BÖLKE, E.; HILTON, S.; GERBER, P. A. Hyaluronidase: from clinical applications to molecular and cellular mechanisms. **European Journal of Medical Research**, v. 21, n. 5, p. 1–7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40001-016-0201-5>
- CEVALLOS, M. A.; NAVARRO-DUQUE, C.; VARELA-JULIA, M.; ALAGON, A. C. Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Toxicon**, v. 30, n. 8, p. 925–930, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(92\)90392-I](https://doi.org/10.1016/0041-0101(92)90392-I)
- DUNN, A. L.; HEAVNER, J. E.; RACZ, G.; DAY, M. Hyaluronidase: a review of approved formulations, indications and off-label use in chronic pain management. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 10, n. 1, p. 127–131, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/14712590903490382>
- DURAN-REYNALS, F. Studies on a certain spreading factor existing in bacteria and its significance for bacterial invasiveness. **Journal of Experimental Medicine**, v. 58, n. 2, p. 161–181, 1933. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.58.2.161>
- FAVORITO, L. A.; BALASSIANO, C. M.; ROSADO, J. P.; CARDOSO, L. E. M.; COSTA, W. S.; SAMPAIO, F. J. B. Structural analysis of the phimotic prepuce in patients with failed topical treatment compared with untreated phimosis. **International Braz J Urol**, v. 38, n. 6, p. 802–808, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1677-553820133806802>
- FENG, L.; GAO, R.; MENG, J.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Cloning and molecular characterization of BmHYA1, a novel hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion *Buthus martensi* Karsch. **Toxicon**, v. 56, n. 3, p. 474–479, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.04.009>
- GELLISSEN, G. (Ed). Production of Recombinant Proteins. Novel Microbial and Eucaryotic Expression Systems. Edited by Gerd Gellissen. 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2005. 404 pp.

FRONZA, M.; CAETANO, G. F.; LEITE, M. N.; BITENCOURT, C. S.; PAULA-SILVA, F. W. G.; ANDRADE, T. A. M.; FRADE, M. A. C.; MERFORT, I.; FACCIOLO, L. H. Hyaluronidase Modulates Inflammatory Response and Accelerates the Cutaneous Wound Healing. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–12, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112297>

GARCIA, L. G. **Biologia Estrutural: Expressão e Caracterização Estrutural da Proteína 25K do Cole latent virus**. Dissertação (Mestrado em microbiologia). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". São José do Rio Preto, p. 46. 2012.

GOLD, E. W. Purification and properties of hyaluronidase from human liver. **Biochem. J.**, v. 205, p. 69–74, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj2050069>

GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the production of recombinant protein in Escherichia coli. **Protein J**, v. 32, p. 419–425, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5>

GUIMARÃES, M. Death swarm. **Pesquisa FAPESP**, November 2008, p. 50–53, 2009.

JOHNSSON, C.; HÄLLGREN, R.; ELVIN, A.; GERDIN, B.; TUFVESON, G. Hyaluronidase ameliorates rejection-induced edema. **Transplant International**, v. 12, n. 4, p. 235–243, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.1999.tb01207.x>

JUSTO JACOMINI, D. L.; CAMPOS PEREIRA, F. D.; SANTOS-PINTO, J. R. A.; SANTOS, L. D.; SILVA NETO, A. J.; GIRATTO, D. T.; PALMA, M. S.; ZOLLNER, R. L.; BROCHETTO BRAGA, M. R. Hyaluronidase from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae): Cloning, structural modeling, purification, and immunological analysis. **Toxicon**, v. 64, p. 70–80, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.12.019>

KHAN, N.; NIAZI, Z. R.; REHMAN, F. U.; AKHTAR, A.; KHAN, M. M.; KHAN, S.; BALOCH, N.; KHAN, S. Hyaluronidases: A Therapeutic Enzyme. **Protein & Peptide Letters**, v. 25, n. 7, p. 663–676, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0929866525666180629121823>

LAEMMLI, U. K.; BEGUIN, F.; GUJER-KELLENBERGER, G. A Factor Preventing the Major Head Protein of Bacteriophage T4 from Random Aggregation. **Journal of Molecular Biology**, v. 47, n. 1, p. 69–85, 1970. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90402-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90402-X)

LAURENT, T. C.; FRASER, J. R. E. Hyaluronan. **FASEB J**, v. 6, p. 2397–2404, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.7.1563592>

LI, M.W.; YUDIN, A. I.; VANDEVOORT, C. A.; SABEUR, K.; PRIMAKOFF, P.; OVERSTREET, J. W. Inhibition of monkey sperm hyaluronidase activity and heterologous cumulus penetration by flavonoids. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 1383–1389, 1997.

LONG-ROWE, K.; BURNETT, J. W. Characteristics of hyaluronidase and hemolytic activity in fishing tentacle nematocyst venom of *Chrysaora quinquecirrha*. **Toxicon**, v. 32, n. 2, p. 165–174, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90105-8](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90105-8)

MENZEL, E. J.; FARR, C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. **Cancer Letters**, v. 131, n. 1, p. 3–11, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(98\)00195-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(98)00195-5)

MOREY, S. S.; KIRAN, K. .; GADAG, J. . Purification and properties of hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. **Toxicon**, v. 47, n. 2, p. 188–195, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.10.014>

OLIVEIRA, T. C. T.; SOUZA, M. M.; PIRES, E. P. Nesting habits of Social wasps (Hymenoptera: Vespidae) in forest fragments associated with anthropic areas in southeastern Brazil. **Sociobiology**, v. 64, n. 1, p. 101–104, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v64i1.1073>

PEREIRA, L. M. **Clonagem, Expressão, Purificação e Caracterização Estrutural da Proteína Ribossomal L10 Humana Recombinante**. Dissertação (Mestrado em Ciências Nucleares). Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 87. 2009.

PEREZ-RIVEROL, A.; SANTOS-PINTO, J. R. A.; LASA, A. M.; PALMA, M. S.; BROCHETTO-BRAGA, M. R. Wasp venom: Unravelling the toxins arsenal of *Polybia paulista* venom and its potential pharmaceutical applications. **Journal of Proteomics**, v. 161, p. 88–103, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.04.016>

PEREZ-RIVEROL, A.; PALMA, M. S.; JAKOB, T. Current challenges in molecular diagnostics of insect venom allergy. **Allergo J Int**, v. 29, p. 79–91, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40629-020-00119-5>

REGATIERI, L. J. **Expressão, purificação e caracterização estrutural de proteínas codificadas por dois fitovírus**. Tese (Doutorado em microbiologia). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". São José do Rio Preto, p. 107. 2014.

REZVANI, S. N.; CHEN, J.; LI, J.; MIDURA, R.; CALI, V.; SANDY, J. D.; PLAAS, A.; WANG, V. M. In-Vivo efficacy of recombinant human hyaluronidase (rHuPH20) injection for accelerated healing of murine retrocalcaneal bursitis and tendinopathy. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 38, n. 1, p. 59–69, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jor.24459>

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 307, p. 249–264, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9603-6>

SANTOS-PINTO, J. R. A.; SANTOS, L. D.; ARCURI, H. A.; DIAS, N. B.; PALMA, M. S. Proteomic Characterization of the Hyaluronidase (E.C. 3.2.1.35) from the Venom of the Social Wasp *Polybia paulista*. **Protein & Peptide Letters**, v. 19, n. 6, p. 625–635, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/092986612800494039>

SCHWAIGHOFER, A.; ABLASSER, S.; LUX, L.; KOPP, J.; HERWIG, C.; SPADIUT, O.; LENDL, B.; SLOUKA, C. Production of Active Recombinant Hyaluronidase Inclusion Bodies from *Apis mellifera* in *E. coli* BL21 (DE3) and Characterization by FT-IR Spectroscopy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 1–14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21113881>

SHUSTER, S.; FROST, G. I.; CSOKA, A. B.; FORMBY, B.; STERN, R. HYALURONIDASE REDUCES HUMAN BREAST CANCER XENOGRAPHS IN SCID MICE. **International Journal of Cancer**, v. 102, n. 2, p. 192–197, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.10668>

SILVA, G.P., BROCHETTO-BRAGA, M.R., RUBERTI, M., TERNERO, M.L., GOBBI, N. A. comparative study of protein and enzymatic activity in venoms of some common wasps (hymenoptera: vespidae) from São Paulo State. **Sociobiology**, v. 44, p. 271–282. 2004.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. **JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING**, v. 99, n. 4, p. 303–310, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1263/jbb.99.303>

SKOV, L. K.; SEPPALA, U.; COEN, J. J. F.; CRICKMORE, N.; KING, T. p.; MONSALVE, R.; KASTRUP, J. S.; SPANGFORT, M. D.; GAJHEDE, M. Structure of recombinant Ves v 2 at 2.0 Å resolution : structural analysis of an allergenic hyaluronidase from wasp venom. **Biological Crystallography**, v. 67, p. 595–604, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1107/S0907444906010687>

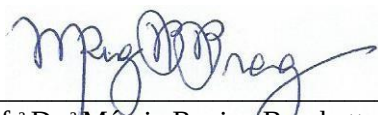
SONG, J. M.; AN, Y. J.; KANG, M. H.; LEE, Y. H.; CHA, S. S. Cultivation at 6–10 °C is an effective strategy to overcome the insolubility of recombinant proteins in Escherichia coli. **PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION**, v. 82, n. 2, p. 297–301, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.01.020>

STERN, R.; JEDRZEJAS, M. J. Hyaluronidases: Their Genomics, Structures, and Mechanisms of Action. **Chem. Rev.**, [s. l.], v. 106, p. 818–839, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr050247k>

VALLEJO, L. F.; RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 3, n. 11, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-3-11>

VERA, A.; GONZÁLEZ-MONTALBÁN, N.; ARÍS, A.; VILLAVERDE, A. The Conformational Quality of Insoluble Recombinant Proteins Is Enhanced at Low Growth Temperatures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, p. 1101–1106, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.21218>

WANG, K.; ZHANG, B.; ZHANG, W.; YAN, J.; LI, J.; WANG, R. Antitumor effects, cell selectivity and structure–activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MPI. **Peptides**, v. 29, n. 6, p. 963–968, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.01.015>



Prof.ª Dr.ª Márcia Regina Brochetto Braga
Orientadora



Ma. Camila Cristiane Pansa
Coorientadora



Lucas Machado Pinto
Aluno