

**Universidade Federal de Viçosa**

Felipe Bastos de Carvalho

**PADRONIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA *Serine Arginine Protein Kinase* DE  
*Leishmania braziliensis* (LbSRPK)**

Viçosa - Minas Gerais

2024

Felipe Bastos de Carvalho

**PADRONIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA *Serine Arginine Protein Kinase* DE  
*Leishmania braziliensis* (LbSRPK)**

Relatório final, apresentado à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Raphael de Souza Vasconcellos

Viçosa - Minas Gerais

2024


Felipe Bastos de Carvalho

**PADRONIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA *Serine Arginine Protein Kinase* DE  
*Leishmania braziliensis* (LbSRPK)**

Relatório final, apresentado à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.


APROVADO: 02 de Setembro de 2024

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 FELIPE BASTOS DE CARVALHO  
Data: 12/09/2024 19:06:41-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Felipe Bastos de Carvalho  
Autor

Documento assinado digitalmente  
 RAPHAEL DE SOUZA VASCONCELLOS  
Data: 12/09/2024 15:42:29-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Raphael de Souza Vasconcellos  
Orientador

## **Agradecimentos**

Agradeço sobretudo a Deus pela minha vida, família e por sua providência.

Aos meus pais pelo amor, companheirismo, incentivo e suporte.

A minha namorada Vitória por seu meu apoio em todos os momentos.

Ao professor Raphael Vasconcellos pelo acolhimento, orientação e confiança.

A Michele Midori, por me acompanhar de perto durante o projeto.

A Júlia Siqueira e Rayane Luiza pelo auxílio nos trabalhos.

A Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de fazer o curso.

A todos os amigos que me apoiaram durante os estudos e estão ao meu lado sempre.

## RESUMO

CARVALHO, Felipe Bastos, Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2024.  
**Padronização da expressão da *Serine Arginine Protein Kinase* de *Leishmania braziliensis* (LbSRPK)**, Orientador: Raphael de Souza Vasconcellos

Leishmanioses são um conjunto de doenças que afetam severamente diversos países pelo mundo, principalmente países tropicais subdesenvolvidos, tendo a sua transmissão por meio de insetos flebotomíneos a partir de indivíduos infectados. Tal doença possui diferentes formas de manifestação, sendo as principais a Leishmaniose tegumentar, causada no Brasil pela *Leishmania braziliensis*, e visceral, que é potencialmente fatal se não houver intervenção médica. No entanto, mesmo os tratamentos mais avançados ainda não são totalmente eficientes, de modo que a doença ainda não possui cura. As principais intervenções que são feitas atualmente utilizam-se de diferentes medicamentos que além da baixa eficácia, são de administração parenteral, de uso restrito e podem levar à reações adversas nos pacientes, que muitas vezes abandonam do tratamento, podendo até mesmo criar resistência por parte do parasito. Tendo isso em vista, há uma urgência cada vez maior no desenvolvimento de formas mais eficazes de intervenção à Leishmaniose e uma das apostas promissoras é na utilização da proteína *Serine Arginine Protein Kinase* (SRPK) recombinante como um alvo farmacológico para os tratamentos. Esta proteína já tem sido utilizada em alguns estudos que utilizam-na como alvo farmacológico no tratamento de outras doenças infecciosas como câncer, degeneração macular, doenças virais e outras mais. Isso se deve ao fato das SRPK's estarem envolvidas em processos importantes do ciclo celular, atuando em proteínas que controlam os processos de splicing e splicing alternativo, ou trans-splicing, no caso de tripanossomatídeos. Diante disso, para que seja possível estudar estas proteínas, realizamos a indução da expressão heteróloga, um procedimento amplamente utilizado para obtenção de proteínas recombinantes. Neste processo, diversos fatores envolvidos na indução da expressão das proteínas precisam ser otimizados para que a expressão seja eficiente, uma vez que estes fatores podem afetar tanto a expressão, como a solubilidade das proteínas, tendo em vista que buscamos expressá-las na fração solúvel para preservar a sua atividade biológica. Diante disso, neste trabalho foi realizada a padronização da condições de expressão da SRPK de *Leishmania braziliensis* (LbSRPK) em cepas de BL21 (DE3) de *Escherichia coli* utilizando o pET28a como vetor de expressão e isopropil  $\beta$ -D -1 tiogalactopiranosídeo (IPTG) como indutor, onde foram testadas diferentes condições de indução com a finalidade de se ter uma maior quantidade da proteína expressa na fração solúvel. Foi testado o impacto de diversos

fatores na solubilidade da proteína, dentre eles: temperatura (37°C, 30°C e 20°C), concentração do indutor (0,1mM e 0,25mM), agitação dos frascos (180 rpm e 90 rpm) e tempo de indução (3h, 4h, 5h, 6h, 18h). Os resultados apontaram diferenças consideráveis na expressão das proteínas nas diversas condições de indução avaliadas, de modo que a indução com maior expressão da proteína na fração solúvel foi utilizando 20°C de temperatura, 180 rotações por minuto dos frascos de 50 mL de meio LB contendo as células transformadas, uma concentração baixa de 0,1mM de IPTG por um período de 18 horas de indução. Além disso, análises de bioinformática da filogenética da SRPK de *Leishmania spp.* e de outros organismo, sobretudo seres humanos, sugerem que as semelhanças entre as SRPK's destes organismo podem estar ligadas a funções críticas da proteína enquanto as diferenças entre elas, decorrentes da adaptação dos organismos e que podem ser exploradas na atuação dos fármacos, podem influenciar as interações com outros componentes celulares ou na regulação da atividade da proteína. Além disso, a alta semelhança entre as SRPK's de mamíferos apoiam a utilização de camundongos nos testes iniciais dos fármacos antes de se testar em seres humanos ou animais domésticos. A partir disso, este trabalho realizou a padronização das condições de indução destas expressões da LbSRPK, a fim de observar as melhores condições para a obtenção das proteínas na fração solúvel e assim servir de referência para futuras induções em maiores escalas da LbSRPK, possibilitando então o estudo aprofundado desta proteína.

## ABSTRACT

CARVALHO, Felipe Bastos, Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2024.  
**Standardization of the expression of *Leishmania braziliensis* Serine Arginine Protein Kinase (LbSRPK).** Orientador: Raphael de Souza Vasconcellos

Leishmaniasis is a group of diseases that severely affects many countries worldwide, particularly in underdeveloped tropical regions. Transmitted by sand flies from infected individuals, these diseases manifest in various forms, with the most common being cutaneous leishmaniasis, caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil, and visceral leishmaniasis, which can be fatal without medical intervention. Despite advanced treatments, a cure remains elusive. Current interventions rely on various drugs that, in addition to having low efficacy, are administered parenterally, have limited availability, and can cause adverse reactions, often leading patients to discontinue treatment and potentially promoting drug resistance in the parasite. Given this, there is a pressing need for more effective interventions against leishmaniasis. One promising approach is targeting recombinant serine/arginine protein kinase (SRPK) as a pharmacological strategy. SRPKs have been investigated as targets in other diseases such as cancer, macular degeneration, and viral infections due to their involvement in essential cellular processes, including splicing and alternative splicing. To study these proteins, we used heterologous expression, a widely adopted method for obtaining recombinant proteins. This process involves optimizing various factors to achieve efficient expression and solubility, as our goal was to express the protein in the soluble fraction to preserve its biological activity. In this study, we standardized the expression conditions of *Leishmania braziliensis* SRPK (LbSRPK) in *Escherichia coli* BL21 (DE3) using the pET28a expression vector and isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) as an inducer. We tested different induction conditions to maximize soluble protein expression. Various factors were evaluated for their impact on protein solubility, including temperature, inducer concentration, agitation rate, and induction time. The results showed significant differences in protein expression under the conditions tested. Optimal expression in the soluble fraction was achieved at 20°C, 180 rpm, in 50 mL of LB medium containing transformed cells, with a low IPTG concentration of 0.1 mM for an 18-hour induction period. Furthermore, bioinformatic analyses of the phylogeny of *Leishmania* spp. SRPKs and other organisms, particularly humans, suggest that similarities between SRPKs may be linked to critical protein functions, while differences due to organismal adaptation could be exploited for drug targeting. The high similarity between mammalian SRPKs supports the use of mice for initial drug testing before

proceeding to trials in humans or domestic animals. In conclusion, this study standardized the induction conditions for LbSRPK expression, identifying optimal conditions for obtaining the protein in the soluble fraction. These findings provide a foundation for future large-scale inductions of LbSRPK, enabling more detailed studies of this protein.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO:</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:</b> .....	<b>2</b>
<b>3. OBJETIVOS:</b> .....	<b>5</b>
3.1. OBJETIVO GERAL:.....	5
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	5
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS:</b> .....	<b>6</b>
4.1. ANÁLISE FILOGENÉTICA DA SRPK.....	6
4.2 CONSTRUÇÃO DO VETOR.....	7
4.3 MULTIPLICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS.....	7
4.3.1 TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO.....	7
4.3.2 TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO.....	8
4.4 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA.....	9
4.4.1 DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS PARA A INDUÇÃO DA EXPRESSÃO... 9	
4.5 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS.....	10
4.6 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	11
4.7 CONFIRMAÇÃO DA PROTEÍNA DE INTERESSE.....	11
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:</b> .....	<b>12</b>
5.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SRPKs:.....	12
5.2 CÁLCULO DO PESO MOLECULAR DA PROTEÍNA DE INTERESSE:.....	17
5.3 ANÁLISE DA SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS:.....	19
<b>6. CONCLUSÕES:</b> .....	<b>25</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:</b> .....	<b>26</b>

## 1. INTRODUÇÃO:

Leishmanioses são um grupo de doenças causadas pelo parasito *Leishmania spp.* e transmitidas através de insetos flebotomíneos fêmeas infectadas, afetando severamente muitos países ao redor do mundo, especialmente os subdesenvolvidos (ASSIMINA; CHARILAOS; FOTOULA, 2014). Apesar de existirem algumas formas de tratamento, dependendo do tipo de manifestação da doença, nenhum tratamento é capaz de eliminar completamente o parasito do hospedeiro, permitindo a reincidência dos sintomas em casos de imunodeficiência do paciente (SARAVIA *et al.*, 1990).

As formas de manifestação da leishmaniose são classificadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em três tipos: Leishmaniose visceral (LV), que é potencialmente fatal se não tratado, afetando órgãos internos como baço, fígado, medula óssea e Leishmaniose Tegumentar (LT), que causa lesões na pele e nas mucosas, como úlceras, podendo causar incapacidade grave ou estigmas. Esta última é a junção de duas subdivisões de manifestação: a Leishmaniose cutânea e mucocutânea. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024)

Ainda de acordo com a OMS (2023), estima-se que ocorram anualmente de 700 mil a 1 milhão de novos casos todos os anos no mundo todo, embora nem todos sejam notificados. Se tratando da LV, estima-se que a ocorrência gira em torno de 50 mil a 90 mil casos anualmente em todo o mundo, sendo que os principais deles ocorrem no Brasil, no Leste da África e na Índia. A LT, que é a manifestação mais comum da doença, a estimativa é de 600 mil a 1 milhão de novos casos por ano, sendo 95% dos casos ocorrendo nas Américas, na bacia do mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central.

Os principais vetores da *Leishmania sp.* são insetos fêmeas da subfamília *Phlebotominae*, sendo no Brasil o principal deles a espécie *Lutzomyia longipalpis*, conhecido popularmente como mosquito palha, que promove a disseminação da *Leishmania braziliensis*, responsável pela LT no país (SECRETARIA DE SAÚDE DO PARANÁ, 2018). Os estudos nacionais a respeito destes vetores acontecem desde 1934 (AMÓRA, 2009) e vem tendo continuidade desde então, a fim de entender sua biologia e como as ações antropológicas interferem no seu ecossistema, podendo assim propor estratégias de controle da transmissão que, aplicados em paralelo aos tratamentos da doença podem reduzir o número de casos de Leishmaniose no país.

Como os tratamentos existentes para esta doença não levam à sua cura, o parasito permanece no organismo do hospedeiro e pode manifestar-se novamente (RIBEIRO, 2019).

Atualmente os principais tratamentos são com uso de medicamentos antimoniais pentavalentes, pentamidinas e anfotericina B lipossomal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017), que além da ineficácia na eliminação completa do parasito, podem causar reações adversas, como náuseas, mialgia, reações cutâneas, anorexia, vômitos, epigastralgia, pirose, dor abdominal, pancreatite, febre, fraqueza, perda auditiva, e muitos outros sintomas que, somado ao fato de serem medicamentos via parenteral e/ou de uso hospitalar restrito, muitas vezes levam ao abandono do tratamento por parte dos pacientes, sobretudo por indivíduos de baixa renda que não tem condições de deslocar-se aos centros de tratamento ou que moram em zonas rurais, podendo levar até mesmo a uma resistência ainda maior do parasito aos fármacos (MINUZZO, 2022; SUNDAR; CHAKRAVARTY; MEENA, 2018).

Tudo isso resulta na urgência das pesquisas relacionadas às Leishmanioses para o desenvolvimento de novas formas de intervenção que sejam efetivas, como tem sido feitas utilizando a proteína *Serine Arginine Protein Kinase* (SRPK) como um alvo farmacológico para o tratamento de doenças infecciosas (LEOPOLDO, 2022), vindo de encontro ao presente estudo, que visa padronizar a expressão heteróloga da proteína SRPK de *Leishmania braziliensis*, um processo amplamente utilizado para a obtenção de proteínas recombinantes (RAI; PADH, 2001), ou seja, utilizando um organismo para expressar uma proteína proveniente de outro organismo. Sabendo que este processo conta com vários parâmetros que afetam a expressão (JHAMB, 2012), o presente estudo se propõe a testar vários destes parâmetros que afetam a expressão a fim de avaliar em quais condições obtemos a maior eficiência na indução da expressão desta proteína, permitindo que a enzima seja produzida em maiores quantidades na sua fração solúvel para sua futura utilização em pesquisas.

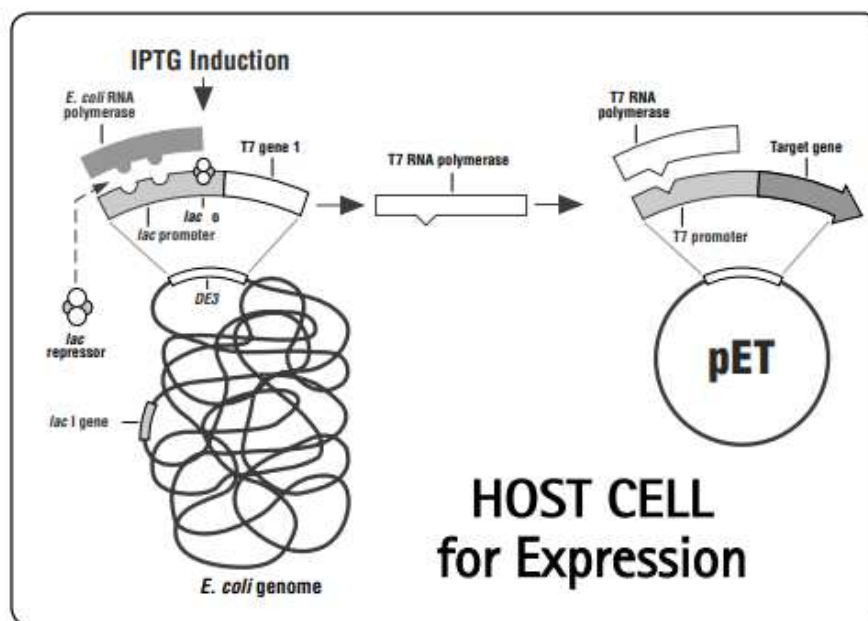
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

Muitos estudos têm sido realizados pelo mundo em busca de alvos farmacológicos que possibilitem novos tratamentos de doenças infecciosas que ainda não possuem um tratamento efetivo. Um dos caminhos com grande potencial é ter as *Serine/Arginine Proteins Kinases* (SRPK's) como um desses alvos farmacológicos, uma quinase que tem apresentado um papel importante no estabelecimento de doenças infecciosas por estarem envolvidas em processos importantes no ciclo celular e no controle da produção de proteínas, como a maturação do RNAm em proteínas responsáveis pelo controle de *splicing* e *splicing alternativo*, entre outros processos (AUBOL & ADAMS, 2014; SHEPARD & HERTEL, 2009). Aliás, esse papel

importante das cinases do ciclo celular já é explorado por algumas pesquisas para o tratamento de câncer, degeneração macular, doenças virais e outras doenças infecciosas (FAIZO, 2019; INÁCIO, 2022; SATOSHI MOROOKA *et al.*, 2015; FERGUSON & GRAY, 2018). No caso de tripanossomatídeos, como as *Leishmanias spp.*, as SRPK's apresentaram similaridades funcionais com as proteínas de eucariotos, abrindo possibilidades para possíveis intervenções para as doenças através de sua SRPK (PORTAL *et al.*, 2003), como foi mostrado em estudos prévios onde a inibição da SRPK de *Leishmania braziliensis* causou a redução dos parasitos, contribuindo com a ideia de colocá-la como um alvo farmacológico para o controle da Leishmaniose (PIMENTEL *et al.*, 2023).

Para que seja possível utilizar as enzimas nos estudos, é necessário conhecer as suas funções biológicas, estrutura, caracterização e para isso é preciso expressar tais proteínas artificialmente. As SRPK podem ser obtidas através de expressões heterólogas (indução da expressão de produtos que não são expressos naturalmente no hospedeiro). O gene desta proteína precisa ser clonado em um vetor de expressão para que possa ser inserido em uma célula bacteriana, por exemplo em *Escherichia coli*, para que assim os genes sejam expressos pelo hospedeiro. Os vetores mais utilizados na expressão de proteínas recombinantes fazem parte do sistema pET, que são plasmídeos desenvolvidos para diferentes tipos de expressão e clonagem em *E. coli* (MIERENDORF *et al.*, 1998). Cada vetor do sistema pET tem características distintas que devem ser analisadas para adequar às necessidades de cada uso. O pET-28a-c(+), por exemplo, é um plasmídeo amplamente utilizado na expressão heteróloga de proteínas em *E. coli*. Nele, a expressão do gene de interesse é controlada pelo promotor T7, um promotor forte e altamente específico para a RNA polimerase T7, que é sintetizada pela célula hospedeira. Além disso, este vetor carrega um gene para resistência à canamicina e uma série de tags de afinidade, incluindo uma His-tag N-terminal, uma sequência de reconhecimento para a trombina e uma T7-tag. A His-tag facilita a purificação da proteína por cromatografia de afinidade em colunas de níquel, enquanto a trombina e a T7-tag podem ser utilizadas para a remoção da His-tag e detecção da proteína, respectivamente (NOVAGEN, 2006). A indução da expressão das proteínas acontece devido a interação do promotor com o IPTG (isopropil  $\beta$ -D -1 tiogalactopiranosídeo), o composto sintético análogo à  $\beta$ -Galactose. No sistema T7, o gene que codifica a RNA polimerase T7 é colocado sob o controle do promotor lac. Esse promotor é normalmente reprimido pelo repressor lacI. O IPTG se liga ao repressor lacI, alterando sua conformação e impedindo que ele se ligue ao operador lac. Com o repressor inativado, a RNA polimerase T7 é livre para se ligar ao promotor T7 e iniciar a transcrição do gene clonado, levando à produção da proteína recombinante. (RIGGS, 2018;

STUDIER; MOFFATT, 1986). A figura 1 ilustra o funcionamento da região promotora do operon lac.



**Figura 1 (pET System Manual) - Atuação do IPTG no sistema T7 durante a expressão de proteínas:** O esquema ilustra o mecanismo de indução da expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* utilizando o sistema T7. A adição de IPTG inibe o repressor LacI, permitindo que a RNA polimerase T7 se ligue ao promotor T7 e inicie a transcrição do gene de interesse, clonado em um plasmídeo pET. A RNA polimerase T7, codificada pelo gene 10 do bacteriófago T7, reconhece especificamente o promotor T7, proporcionando altos níveis de expressão da proteína recombinante.

Para manipular e estudar as SRPK's após induzir a expressão, a solubilidade é um fator muito importante, uma vez que afeta diretamente a sua atividade biológica. De modo geral, após a indução é possível obter a proteína na fração solúvel ou a formação de corpos de inclusão, que são agregados insolúveis de proteínas que se formam no citoplasma bacteriano quando a taxa de produção de uma proteína recombinante excede a capacidade da célula de dobrá-la corretamente. Sabendo-se que as condições de indução, como temperatura, concentração de IPTG, pH, tempo de indução, etc, podem alterar direta ou indiretamente a solubilidade da proteína (JHAMB, 2012; GOMES; MONTEIRO; MERGULHÃO, 2020), é altamente importante que essas condições sejam controladas para que obtenhamos a proteína na fração solúvel, pois dessa forma temos uma maior preservação da atividade biológica

devido ao fato da proteína estar na sua forma nativa e com isso uma maior facilidade de purificação por métodos cromatográficos, como utilizando uma coluna de níquel ligando-se à cauda de histidina que foi adicionada pelo vetor de expressão à proteína, por exemplo. As proteínas do corpo de inclusão (fração insolúvel), embora também possuam diversas vantagens comerciais, como o alto grau de pureza, maior proteção contra ação proteolítica, maior nível de expressão, etc (SINGH, 2005; VALLEJO, 2004), normalmente perdem sua atividade biológica e acabam necessitando de uma série de procedimentos muito mais complexos para sua restauração e purificação.

O presente trabalho visa testar diferentes variáveis na indução da expressão da LbSRPK a fim de definir as condições ideais para se obter a maior produção da proteína na fração solúvel.

### **3. OBJETIVOS:**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL:**

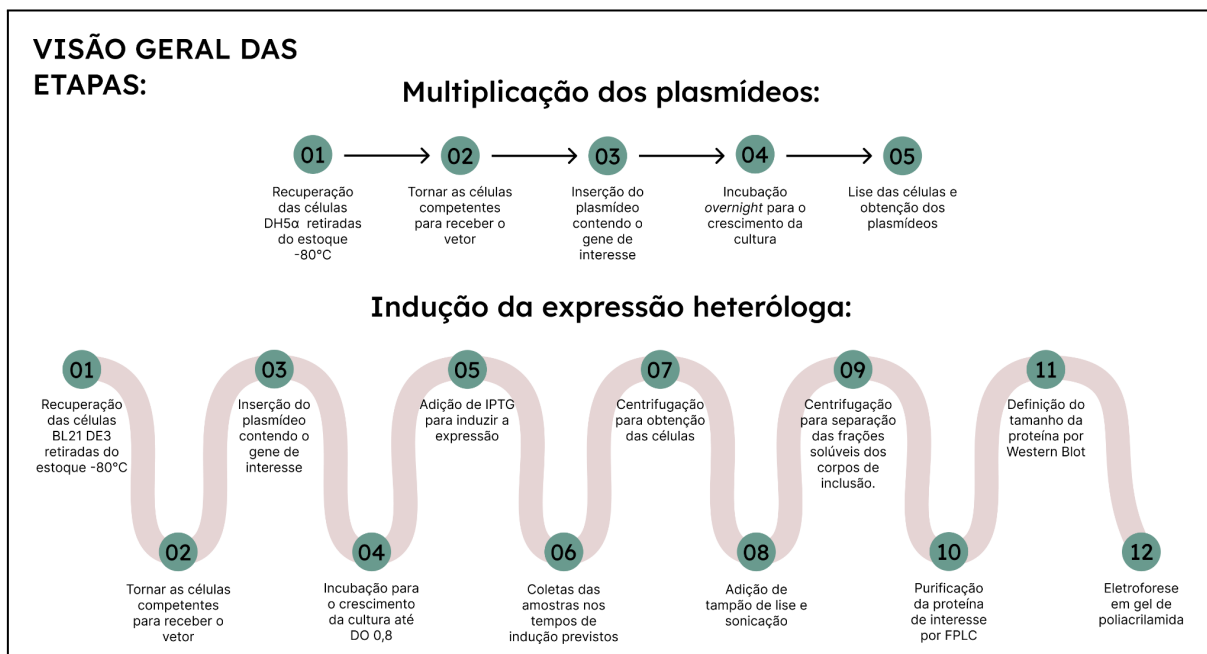
- Padronização da expressão da SRPK de *L. braziliensis* (LbSRPK) recombinante em BL21 DE3

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Cultivar as cepas de *E. coli* BL21 DE3 e DH5 $\alpha$ ;
- Inserir e multiplicar em *E. coli* DH5 $\alpha$  o plasmídeo contendo gene clonado de LbSRPK por choque térmico;
- Cultivar as células em meio Luria Bertani (LB) utilizando os antibióticos adequados;
- Inserir e expressar em *E. coli* BL21 DE3 o plasmídeo contendo gene clonado de LbSRPK por choque térmico;
- Padronizar condições de expressão que favoreçam a solubilidade da proteína;
- Utilizar SDS-PAGE e Western Blotting para levantar e avaliar os dados obtidos das diferentes condições de expressão;
- Purificar a proteína por meio de cromatografia por afinidade.
- Análise da relação filogenética das SRPKs de *Leishmania spp.* com outros organismos.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS:

Tendo em vista que este trabalho é dotado de várias etapas, a figura 2 mostra uma visão geral dos procedimentos executados:



**Figura 2 - Visão geral de cada etapa do trabalho:** Na parte superior é descrito os experimentos realizados para a multiplicação e clonagem dos plasmídeos. Na parte inferior são descritas as etapas da indução da expressão heteróloga de proteínas recombinantes.

#### 4.1. ANÁLISE FILOGENÉTICA DA SRPK

Para avaliar a viabilidade da proteína LbSRPK como um possível alvo farmacológico, obtivemos as sequências dos genes para SRPK de outros organismos, especialmente de *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus* através das plataformas Trityp e UniProt e usamos o software Mega para fazer o alinhamento das sequências de bases das SRPK's de todos os organismos, incluindo a sequência da proteína de interesse (código de acesso do Trytrip: LbrM.30.3610). Com o alinhamento das bases concluído, foi construída uma árvore filogenética com base nas regiões conservadas e não conservadas, separando assim os diferentes clados. Também foi realizado um segundo alinhamento de múltiplas sequências (MSA) utilizando o Clustal Omega e o Jalview para obter uma visão geral destas regiões conservadas e distintas, onde também foi obtida a matriz de percentual de identidade das sequências.

## 4.2 CONSTRUÇÃO DO VETOR

Tendo a sequência para o gene da proteína de SRPK de *Leishmania braziliensis* após avaliar sua sua viabilidade como possível alvo farmacológico, o gene foi sintetizado comercialmente pela Synbio e inserido no vetor de expressão.

Para a construção do vetor de expressão, a sequência nucleotídica da quinase SRPK de *Leishmania braziliensis* (LbSRPK) foi alinhada com a da SRPK1 humana utilizando o software Clustal. Com base nesse alinhamento, os domínios cinases foram identificados e selecionados para clonagem. O vetor utilizado foi o pET28a-c(+), que possui como marcador de seleção a resistência à ampicilina (AMP) e canamicina (KAN). Sua região promotora é T7 induzível com IPTG e também possui gene que confere à proteína uma cauda de histidina (Tag His) que auxilia na purificação das proteínas utilizando cromatografia por afinidade, o que torna este vetor bastante interessante para este trabalho. No presente trabalho foi utilizado a canamicina como marcador de seleção a uma concentração de 0,6µL/mL nos meios de cultura LB (Tryptona: 10 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl: 10 g/L; Ágar: 15 g/L em meios sólidos).

## 4.3 MULTIPLICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS

Antes de partir para a expressão propriamente dita foi feita a clonagem e multiplicação do gene para a LbSRPK presente no vetor de expressão. Para isso foi utilizada a cepa de *E. coli* DH5α, uma vez que ela não possui o gene da RNA polimerase T7, o que a torna ineficiente para a expressão de proteínas sob o controle do promotor T7. Por outro lado, esta cepa possui várias mutações que a tornam eficiente na recombinação e replicação de DNA.

As células foram recuperadas a partir do estoque a -80 °C, inoculadas em placas contendo meio de cultura LB sólido e incubadas *overnight* a 37 °C. A partir de uma colônia isolada, que foi novamente multiplicada desta mesma forma, foram utilizados dois métodos para tornar as células competentes para poderem receber os plasmídeos e cultivadas *overnight* a 37 °C.

### 4.3.1 TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO

A colônia isolada foi transferida para 100mL de meio LB em um Erlenmeyer de 1L e incubada de 16h a 20h a 37°C sob agitação vigorosa de

230 RPM. Foi feita a medição periódica da densidade óptica (DO) a um comprimento de onda de 600 nm ( $DO_{600}$ ) até alcançar a  $DO_{600}$  de 0,4, para obter uma maior eficiência na transformação. As células foram transferidas para tubos tipo Falcon de 50mL e mantidas no gelo por 10 minutos. Em seguida, foi feita a centrifugação a 2700g por 10 minutos a 4°C e descartado todo o meio de cultura. O *pellet* foi gentilmente ressuspensionado em 30mL de solução de 80 mM  $MgCl_2$  - 20 mM  $CaCl_2$ . Foi feita uma nova centrifugação a 2700 g por 10 minutos a 4°C e descartado totalmente o sobrenadante. Em seguida, o pellet foi ressuspensionado em 2 mL de  $CaCl_2$  0,1 M gelado para cada 50 mL de cultura original.

Para a transformação por choque térmico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), foram usados entre 6 e 10  $\mu$ L de DNA em um tubo contendo 200  $\mu$ L de células competentes e mantidas no gelo por 30 minutos. Este foi rapidamente transferido para o banho-maria a 42°C durante 90 segundos e novamente com agilidade transferido para o gelo por cerca de 5 minutos. Foi então adicionado 800  $\mu$ L de meio LB sem antibiótico ao tubo e incubado por no mínimo 40 minutos a 37°C. Em seguida foi transferido cerca de 100  $\mu$ L para uma placa contendo meio LB sólido contendo 15 g/L de ágar, o antibiótico canamicina (0,6 $\mu$ L/mL) como marcador de seleção e cultivado *overnight* a 37°C.

#### 4.3.2 TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO

Um pré-inóculo com a DH5 $\alpha$  em meio LB foi cultivado *overnight* a 37°C e 180 rpm. A partir de uma colônia isolada, um novo inóculo em meio LB foi incubado a 37°C com monitoramento periódico da  $DO_{600}$  até chegar entre 0,35 e 0,4. As células foram colocadas no gelo por 30 minutos e centrifugadas a 1000 g por 10 minutos a 4°C. O meio de cultura foi totalmente descartado e o pellet ressuspensionado em 500 mL de água gelada ultrapura autoclavada. Novamente foi feita a centrifugação por 20 minutos a 4°C e ressuspensionado em 250 mL de água ultrapura com adição de 10% de glicerol gelado autoclavado. Foi feita uma nova centrifugação a 1000 g por 20 minutos e 4°C, seguido da ressuspensão em 10 mL de glicerol 10%. Novamente centrifugado, porém agora a 500 g por 20 minutos e 4°C e ressuspensionado em

1mL de glicerol 10% gelado autoclavado e por fim, aliquotado em 60  $\mu$ L por tubo e estocado em  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para a transformação por eletroporação. As células foram mantidas no gelo por 15 minutos. Em seguida foi adicionado cerca de 10  $\mu$ L de DNA e novamente mantido no gelo por 20 minutos. As células foram transferidas para uma cubeta de 2,5 mm compatível com o eletroporador Bio-Rad (utilizando programa *E. coli*) e foi feita a eletroporação. Em seguida, foi adicionado 200 $\mu$ L de meio na cubeta, homogeneizado e transferido para um tubo de 1,5 mL, onde foi completado a quantidade de meio até 1mL e incubado por 40 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  e 180 rpm.

#### **4.4 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA**

A célula hospedeira utilizada para expressar a proteína foi a cepa de *E. coli* BL21 DE3, uma vez que ela possui o gene da RNA polimerase T7 integrado em seu genoma. Essa enzima reconhece especificamente o promotor T7 presente em vetores de expressão como o pET28a-c(+), proporcionando altos níveis de transcrição e, conseqüentemente, de expressão da proteína recombinante. Além disso, esta cepa não possui os genes *lon* e *ompT*, que codificam proteases. Essa deleção aumenta a estabilidade de proteínas recombinantes, evitando sua degradação e modificação (RIGGS, 2018). As células foram recuperadas a partir do estoque a  $-80^{\circ}\text{C}$ , inoculadas em placas contendo meio de cultura LB sólido e incubadas *overnight* a  $37^{\circ}\text{C}$

A transformação para inserção dos plasmídeos contendo os genes previamente clonados foi realizada por meio de três choques térmicos e mantidas no gelo pelo período de 15 minutos até adicionar 350  $\mu$ L de meio LB, seguido da incubação por no mínimo 40 minutos para a recuperação das células. Em seguida, transferiu-se para placas contendo LB e o antibiótico recomendado pelo pET e colocado para cultivo *overnight*.

##### **4.4.1 DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS PARA A INDUÇÃO DA EXPRESSÃO**

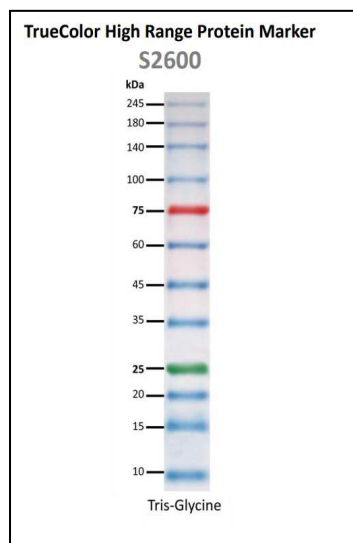
As induções foram feitas a partir de uma colônia isolada inoculada em 50mL de meio LB contendo as BL21 DE3 contendo o gene de interesse

previamente clonado e canamicina a 0,6  $\mu\text{L}/\text{mL}$  como marcador de seleção. As diferentes condições de cultivo testadas envolvem: concentração do indutor IPTG (Sigma®) de 0,1mM e 0,25mM, ambos adicionados com a cultura a uma  $\text{DO}_{600}$  de 0,8; adição de 2% a 6% de etanol no meio de cultura; temperaturas de incubação de 20 °C, 30 °C e 37 °C; tempo de indução de 3h, 4h, 5h, 6h e 18h, coletando amostras de 5 mL em cada um dos tempos, além de coletar uma amostra antes da adição do IPTG para observar expressão sem o indutor.

As amostras coletadas das induções de expressão foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos a 4 °C e os pellets foram ressuspensos em 4 mL de tampão de lise (50mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20 mM imidazol e 5% glicerol, pH 7,5) contendo 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dos inibidores de protease leupeptina, aprotinina e pepstatina, além de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de lisozima. Para realizar a lise das células, após permanecer no gelo por 30 minutos, as amostras passaram pelo processo de sonicação (CV18 Vibra Cell™ - Sonics) por 5 minutos (10 pulsos de 30 segundos com amplitude 100 e 30 segundos de intervalo entre cada um dos pulsos). Após a lise das células, a solução foi centrifugada a 4 °C e 12.500 x g por 30 minutos a fim de separar-se as frações solúveis e o corpo de inclusão. A fração solúvel foi coletada e a insolúvel foi ressuspensa com tampão de lise contendo 8 M de ureia e novamente centrifugadas nas mesmas condições da última centrifugação a fim de coletar e armazenar também a fração insolúvel.

#### **4.5 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS**

Para ter a confirmação das proteínas e identificar se estavam presentes na porção solúvel ou não solúvel foi utilizado uma eletroforese em gel de SDS-PAGE. As amostras foram preparadas com 15 $\mu\text{L}$  da solução com as células e 5  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra com  $\beta$ -mercapto, fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel de poliacrilamida a 12%. (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Também foi aplicado no gel o marcador Sinapse TrueColor High Range Protein Marker s2600, que está mostrado na figura 3.



**Figura 3 - Marcador de proteínas:** Sinapse TrueColor High Range Protein Marker S2600 (9-245 kDa)

A corrida foi realizada a tensões de 90V, 120V e 140V e em seguida corado utilizando uma solução de Coomassie brilliant blue R-250 em constante agitação por 30 minutos, seguido da utilização de um tampão descolorante contendo etanol e ácido acético até evidenciar as bandas no gel.

#### 4.6 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Para purificar a LbSRPK as frações solúvel e insolúvel foram filtradas e adicionadas em colunas de Níquel (HisTrap™ Crude FF) no FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*), de modelo AKTA PURIFIER UPC10 (GE Healthcare). O fluxo no aparelho foi de 0,5 mL/min e as frações correspondem ao volume não ligado, lavagem (que foi feita utilizando 50mM de Tris-HCl; 100mM de NaCl, 20mM de Imidazol e 5% de glicerol) e eluição foram coletadas para serem avaliadas em gel de SDS-PAGE.

#### 4.7 CONFIRMAÇÃO DA PROTEÍNA DE INTERESSE

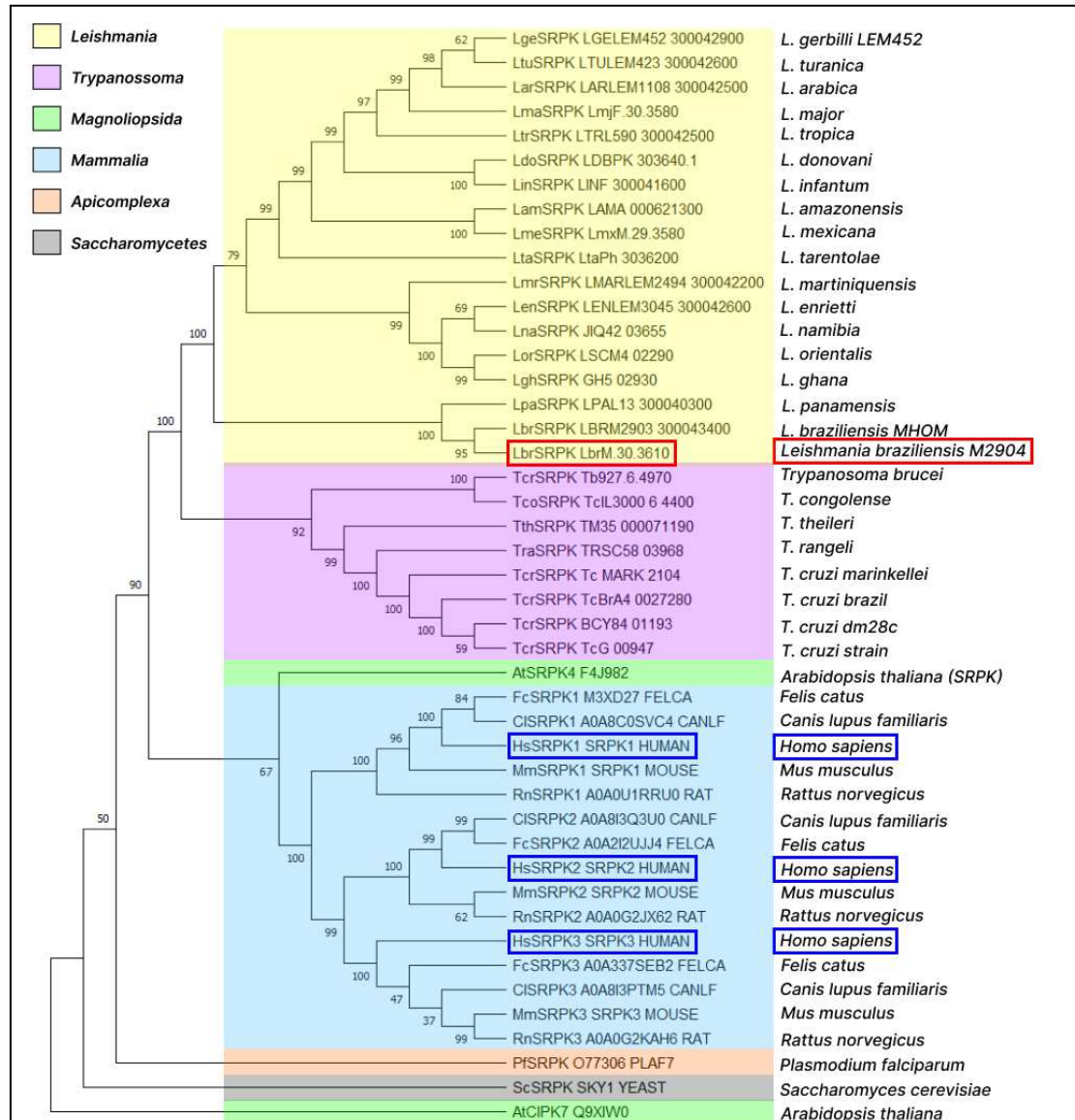
A fim de confirmar a presença da LbSRPK nas frações coletadas após a purificação, realizamos a técnica de Western Blot (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Essa técnica permite a detecção de proteínas específicas em uma amostra complexa. Aliquotas das frações coletadas da purificação foram misturadas com tampão de amostra contendo SDS

(dodecil sulfato de sódio),  $\beta$ -mercaptoetanol e um corante (azul de bromofenol). Essa mistura foi submetida a fervura para desnaturar as proteínas e quebrar as pontes dissulfeto. As amostras desnaturadas foram carregadas em poços de um gel de poliacrilamida de 12% e submetidas a um campo elétrico de 400V por cerca de uma hora e meia. As proteínas migraram pelo gel de acordo com seu tamanho molecular. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, que foi incubada com uma solução de leite em pó desnatado para bloquear os sítios não específicos da membrana, evitando assim a ligação não específica de anticorpos. Posteriormente, a membrana foi incubada com um anticorpo primário específico anti-His de *mouse*, que reconhece a sequência de histidina presente na proteína (dada a ela pelo vetor de expressão). A diluição do anticorpo primário foi de 1:5000. Após lavagens para remover o anticorpo primário não ligado, a membrana foi incubada com um anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado à peroxidase na diluição de 1:8000. Esse anticorpo se liga ao anticorpo primário e possui uma enzima (peroxidase) que catalisa uma reação quimiluminescente. A membrana foi incubada com um substrato quimiluminescente, que emite luz quando a peroxidase entra em contato com ele. A emissão de luz foi capturada em um filme radiográfico ou por um sistema de quimiluminescência, revelando as bandas correspondentes às proteínas que reagiram com os anticorpos. A revelação utilizou 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

### **5.1 ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SRPKs:**

O alinhamento dos genes de SRPK de *Leishmania braziliensis* com SRPK's de outros organismos possibilitou uma análise filogenética de similaridade entre elas, conforme é mostrado na figura abaixo:



**Figura 4-A:** Relação filogenética da SRPK de diferentes grupos de organismos. Os nomes estão acompanhados do código de acesso no Tritryp (*Leishmania* e *Trypanosoma*) e UniProt (demais grupos). O destaque em vermelho refere-se à LbSRPK que foi utilizada neste trabalho. Os destaques em azul referem-se às SRPK's de humanos.

Com base nas figuras 4-B e 4-C é possível observar uma conservação de 58.25% entre a LbSRPK e TcSRPK, que apesar de serem indivíduos pertencentes à mesma família (*Trypanosomatidae*), ainda sim tem uma diferença relativamente alta entre si.

Ainda com base na matriz da figura 4-C, comparando agora com seres humanos, vemos que há uma distância considerável entre a SRPK de *Leishmania braziliensis*

(LbSRPK) com as de *Homo Sapiens* HsSRPK1, HsSRPK2, HsSRPK3 (40.32%, 39.77% e 40% respectivamente). As regiões conservadas entre elas remetem a um ancestral comum dos organismos, podendo estar ligadas a funções primordiais, como a função da SRPK. Por outro lado, as regiões distintas entre as SRPK's se devem justamente à adaptação evolutiva de cada um destes organismo, estando possivelmente ligadas à funções secundárias, mas que também acabam tendo impacto na função da proteína. Isso corrobora com a possibilidade de colocar estas regiões distintas que a LbSRPK tem dos demais organismos como um alvo farmacológico para o tratamento de Leishmaniose, uma vez que a chance de um fármaco afetar a SRPK de humanos é pequena, tendo em vista a baixa similaridade entre elas.

Outro detalhe importante que vemos na árvore filogenética e confirmamos na matriz do percentual de identidade das sequências é a alta similaridade das SRPKs de humanos com as isoformas de camundongos RnSRPK1, RnSRPK2, RnSRPK3 (89.08%, 92.36%, 94.44% respectivamente), que são frequentemente utilizados em testes laboratoriais *in vivo*. Por causa desta similaridade entre eles, eles podem ser um excelente parâmetro para averiguar a eficiência dos fármacos que serão testados antes de qualquer aplicação em seres humanos. Essa filogenia aponta também uma grande similaridade entre SRPK's de humanos com os cães C1SRPK1, C1SPRK2, C1SRPK3 (96.49%, 96.21%, 96.44% respectivamente), que possuem um papel importante no controle e na propagação da Leishmaniose (TORRES, F. D., 2024), uma vez que são grandes armazenadores da doença e por serem animais domésticos, possuem uma interação muito alta com os seres humanos, o que resulta na maior facilidade da propagação da doença. Esta alta similaridade entre as SRPK's de homens e cães abre possibilidade para que o tratamento em ambos os organismos seja bem parecido.

A similaridade das SRPK's e, conseqüentemente, a distância filogenética entre elas pode ser melhor evidenciada analisando o alinhamento das sequências dos diferentes organismos de interesse, como é mostrado na figura 4-B. É possível observar que há uma conservação de sequências de aminoácidos muito maior entre os mamíferos em relação à SRPK de *Leishmania braziliensis*. Essa conservação é mostrada nas sequências coloridas, onde as cores indicam que os aminoácidos daquela região são semelhantes e/ou podem indicar funções semelhantes. A presença de regiões altamente conservadas nos alinhamentos indica que essas regiões são essenciais para a função catalítica da quinase. Essas regiões provavelmente correspondem aos sítios ativos e aos sítios de ligação para o ATP e para o substrato. As regiões mais variáveis podem estar relacionadas a funções reguladoras ou a interações específicas com outras proteínas ou moléculas. Essas regiões podem ser exploradas

para o desenvolvimento de inibidores seletivos. Tendo em vista que muitas destas sequências já possuem funções conhecidas na literatura e considerando que as sequências de aminoácidos possuem um papel importante na estrutura das proteínas (GHOSH; ADAMS, 2011).



**Figura 4-B:** Alinhamento de múltiplas sequências (MSA) de SRPK's conhecidas na literatura, feita pelo Clustal Omega. As regiões de mesma cor representam conservação da sequência, sendo que as cores indicam conservação de aminoácidos. LbSRPK: *Leishmania braziliensis*; TcrSRPK: *Trypanosoma cruzi*; PfsSRPK: *Plasmodium falciparum*; RnSRPK(1,2,3): *Rattus norvegicus*; HsSRPK(1,2,3): *Homo sapiens*; ClSRPK(1,2,3): *Canis lupus familiaris*; A primeira linha destacada em vermelho é referente à sequência de aminoácidos da LbSRPK.

1: LbSRPK	100.00	58.25	33.33	40.78	40.32	35.89	39.77	39.63	37.31	39.61	40.00	40.00
2: TcrSRPK	58.25	100.00	35.05	40.72	39.60	34.92	41.26	41.42	39.28	41.34	41.53	41.81
3: PfsSRPK	33.33	35.05	100.00	33.78	33.17	33.60	32.02	33.13	32.21	32.87	32.67	32.31
4: RnSRPK1	40.78	40.72	33.78	100.00	89.08	89.23	60.11	62.10	60.23	64.53	64.79	63.55
5: HsSRPK1	40.32	39.60	33.17	89.08	100.00	96.49	59.92	61.88	59.66	63.85	63.64	62.35
6: ClSRPK1	35.89	34.92	33.60	89.23	96.49	100.00	59.53	61.55	57.79	63.51	63.64	62.12
7: HsSRPK3	39.77	41.26	32.02	60.11	59.92	59.53	100.00	96.44	94.16	65.23	65.53	65.65
8: ClSRPK3	39.63	41.42	33.13	62.10	61.88	61.55	96.44	100.00	96.62	67.05	66.92	67.24
9: RnSRPK3	37.31	39.28	32.21	60.23	59.66	57.79	94.16	96.62	100.00	65.06	65.05	65.35
10: RnSRPK2	39.61	41.34	32.87	64.53	63.85	63.51	65.23	67.05	65.06	100.00	93.12	92.36
11: ClSRPK2	40.00	41.53	32.67	64.79	63.64	63.64	65.53	66.92	65.05	93.12	100.00	96.21
12: HsSRPK2	40.00	41.81	32.31	63.55	62.35	62.12	65.65	67.24	65.35	92.36	96.21	100.00

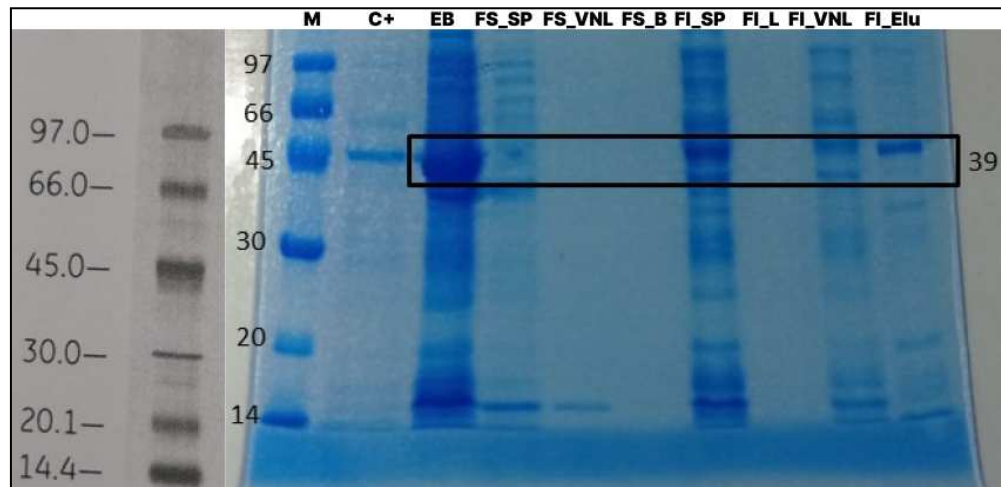
**Figura 4-C:** Matriz do percentual de identidade de sequências. LbSRPK: *Leishmania braziliensis*; TcrSRPK: *Trypanosoma cruzi*; PfsSRPK: *Plasmodium falciparum*; RnSRPK(1,2,3): *Rattus norvegicus*; HsSRPK(1,2,3): *Homo sapiens*; ClSRPK(1,2,3): *Canis lupus familiaris*.

## 5.2 CÁLCULO DO PESO MOLECULAR DA PROTEÍNA DE INTERESSE:

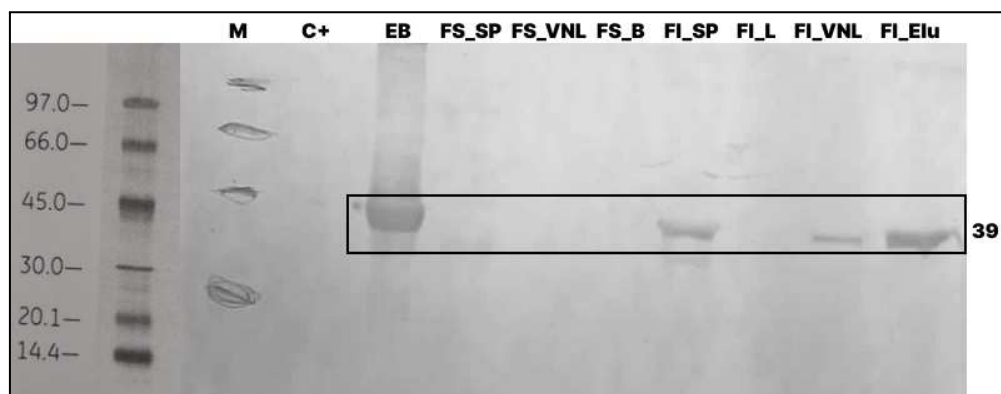
As induções da LbSRPK foram realizadas em diferentes condições de cultivo, a fim de observar quais as condições que melhor favorecem a obtenção das proteínas na fração solúvel. todas as condições para a corrida eletroforéticas foram padronizadas e o melhor resultado foi 120V por aproximadamente 40 minutos.

A altura da proteína de interesse foi calculada a partir de uma indução da expressão em meio LB a 37 °C durante 2 horas e 180 rpm. Como a finalidade não era obter uma expressão em maior escala, mas apenas ter a proteína para avaliar seu tamanho, o tempo de indução de 2 horas é suficiente. Em seguida, foi promovida a lise das células e separação da fração solúvel e insolúvel. Ambas foram purificadas por cromatografia por afinidade utilizando-se coluna de níquel que se liga à cauda de histidina na proteína e posteriormente o peso molecular da proteína pôde ser calculado por Western Blotting utilizando-se anticorpos anti-His para detectar a proteína de interesse através da Tag-His presente nela e usando um

software para calcular o peso molecular aproximado da proteína. O resultado do Western Blotting é descrito na figura seguir:



**Figura 5-A - Gel espelho do Western Blotting:** O retângulo preto evidencia a detecção da proteína LbSRPK na membrana de Western Blotting de uma indução realizada a 37°C durante 2 horas e 180 rpm. M: Marcador; C+: Controle positivo; EB: Extrato bruto; FS\_SP: Fração solúvel sem purificação; FS\_VNL: Volume não ligado da fração solúvel; FS\_B: Fração solúvel com 100% de tampão B; FI\_SP: Fração insolúvel sem purificação; FI\_L: Lavagem da fração insolúvel; FI\_VNL: Volume não ligado da fração insolúvel; FI\_Elu: Eluição da fração solúvel.



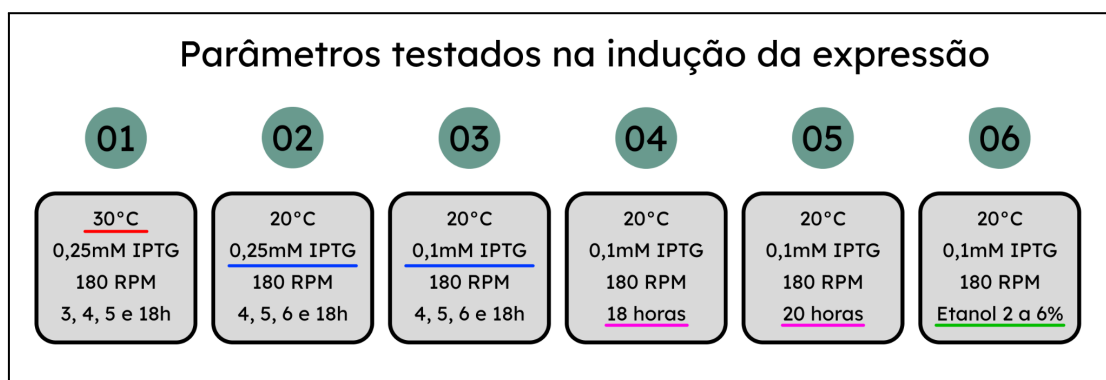
**Figura 5-B - Verificação da altura da LbSRPK após Western Blotting:** O retângulo preto evidencia a detecção da proteína LbSRPK na membrana de Western Blotting de uma indução realizada a 37°C durante 2 horas e 180 rpm. M: Marcador; C+: Controle positivo; EB: Extrato bruto; FS\_SP: Fração solúvel sem purificação; FS\_VNL: Volume não ligado da fração solúvel; FS\_B: Fração solúvel com 100% de tampão B; FI\_SP: Fração insolúvel sem purificação; FI\_L: Lavagem da fração

insolúvel; FI\_VNL: Volume não ligado da fração insolúvel; FI\_Elu: Eluição da fração insolúvel.

Como podemos observar nas figuras 5-A e 5-B, foi identificado a presença da LbSRPK na última canaleta, contendo a fração insolúvel eluída (FI\_Elu), na altura de aproximadamente 39 kDa. Esse resultado foi usado como parâmetro para a observação das outras expressões da proteína.

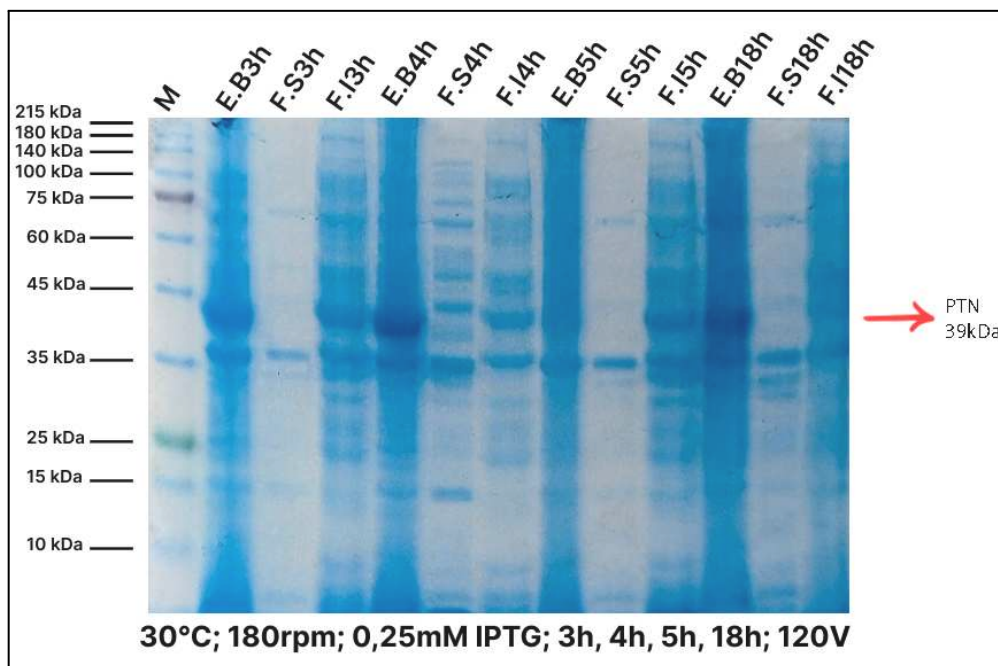
### 5.3 ANÁLISE DA SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS:

Ao todo foram realizadas 6 induções testando diferentes parâmetros para que fosse possível padronizar a expressão. A figura 6 mostra uma visão geral dos parâmetros definidos para cada expressão.



**Figura 6 - Parâmetros das expressões:** Esquema contendo os parâmetros utilizados para as 6 diferentes induções de expressão realizadas. As linhas destacam o parâmetro que estava sendo observado em cada uma das expressões.

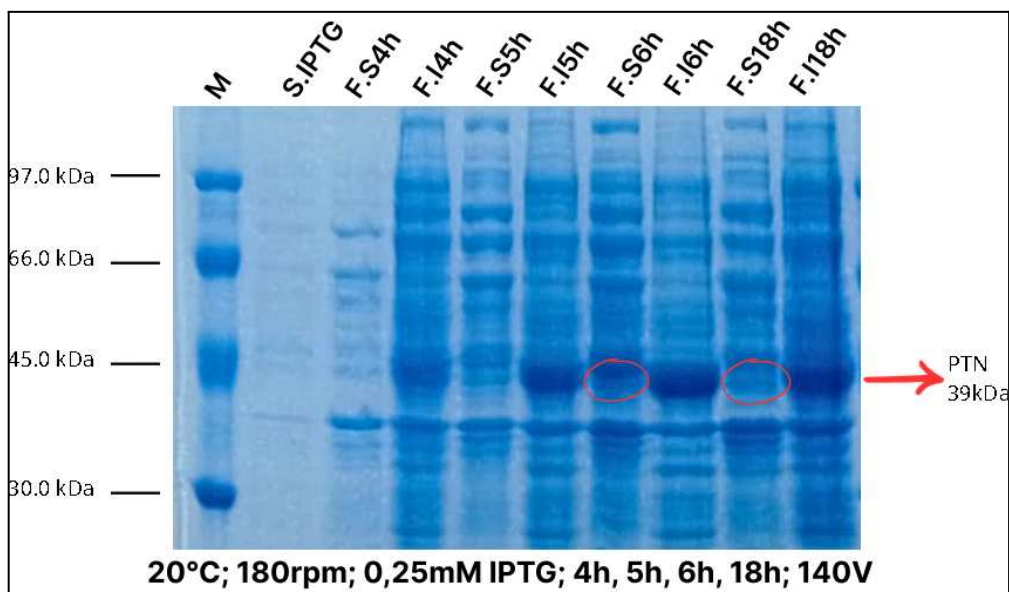
A primeira expressão a ser realizada foi para verificar a solubilidade das proteínas quando cultivadas a uma temperatura de 30 °C, conforme é mostrado na figura 7 a seguir:



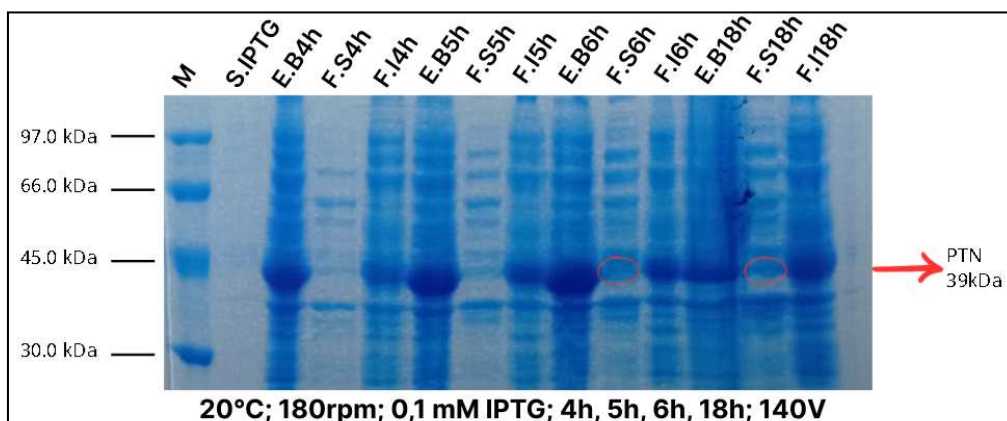
**Figura 7 - Resultado da indução feita 30°C, 180 rpm, 0.25mM IPTG, durante 3h, 4h, 5h e 18h horas de indução:** A corrida no gel de poliacrilamida foi feita a uma tensão de 120V. M: Marcador; E.B: Extrato Bruto; F.S: Fração Solúvel; F.I: Fração Insolúvel (corpo de inclusão).

O crescimento em 30°C apresentou, no geral, uma presença predominante das proteínas nos corpos de inclusão. Temperaturas mais elevadas conferem maior energia cinética às proteínas, que aumenta as colisões entre elas. Somando isso ao fato de que temperaturas maiores podem levar a uma desnaturação parcial das proteínas, expondo regiões hidrofóbicas, é provável que haja uma maior formação de aglomerados e corpos de inclusão. A maior agregação das proteínas em temperaturas mais elevadas já era esperada, tendo em vista outros trabalhos que mostram que o aumento da temperatura também aumenta a variação da energia de Gibbs, potencializando o surgimento de agregados (ROSA; ROBERTS; RODRIGUES, 2017). No entanto, foi possível observar uma banda na fração solúvel da indução de 4 horas em tamanhos próximos aos 39 kDa, na região da proteína de interesse, que pode estar relacionada ao estresse celular, de modo que em 4 horas de indução a célula esteja melhor adaptada a superexpressão das proteínas do que nos outros tempos.

Partindo para uma temperatura mais baixa, a concentração do indutor (IPTG) e diferentes tempos de indução também foram testadas. As figuras 8-A e 8-B mostram o resultado do SDS-PAGE para estas induções.



**Figura 8-A - Resultado da indução com 0,25mM IPTG:** A indução foi feita a 20°C, 180 rpm, durante 4h, 5h, 6h e 18 horas de indução. A corrida no gel de poliacrilamida foi feita a uma tensão de 140V. M: Marcador; S.IPTG: Sem indutor; F.S: Fração Solúvel; F.I: Fração Insolúvel (corpo de inclusão).



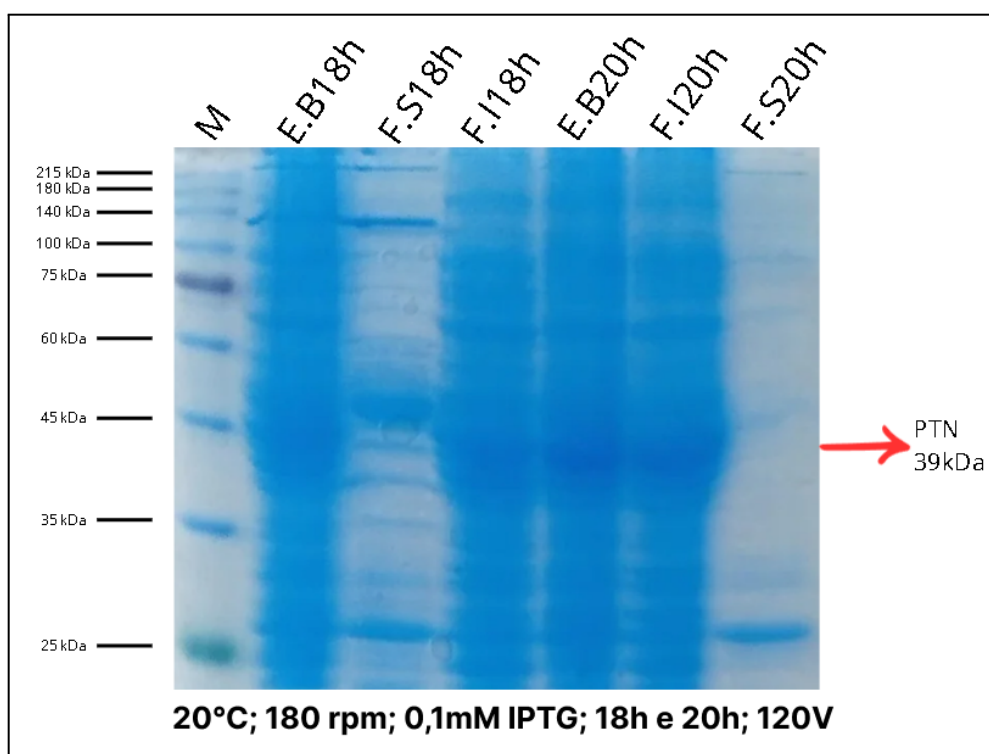
**Figura 8-B - Resultado da indução com 0,1mM IPTG:** A indução foi feita a 20°C, 180 rpm, durante 4h, 5h, 6h e 18 horas de indução. A corrida no gel de poliacrilamida foi feita a uma tensão de 140V. M: Marcador; S.I: Sem indutor; F.S: Fração Solúvel; F.I: Fração Insolúvel (corpo de inclusão).

No geral a redução de 30°C para 20°C resultou numa maior solubilidade das proteínas, tendo uma concentração maior e bem parecida em 6 horas e 18 horas de indução. Os corpos de inclusão permanecem em maiores quantidades em relação às frações solúveis. A segunda

canaleta do gel foi o controle negativo, mostrando que a ausência do indutor resultava numa expressão extremamente mais baixa de proteínas. Como a diferença da concentração do indutor não foi significativamente impactante no resultado, foi definido a concentração de 0,1mM para os testes posteriores, indo de encontro com trabalhos que demonstraram que uma alta concentração de IPTG pode reduzir bastante o rendimento da indução, além de ser um composto caro e potencialmente tóxico, sobretudo quando induz a produção de proteínas tóxicas ou de proteases (LARENTIS, A. L. *et al.*, 2014).

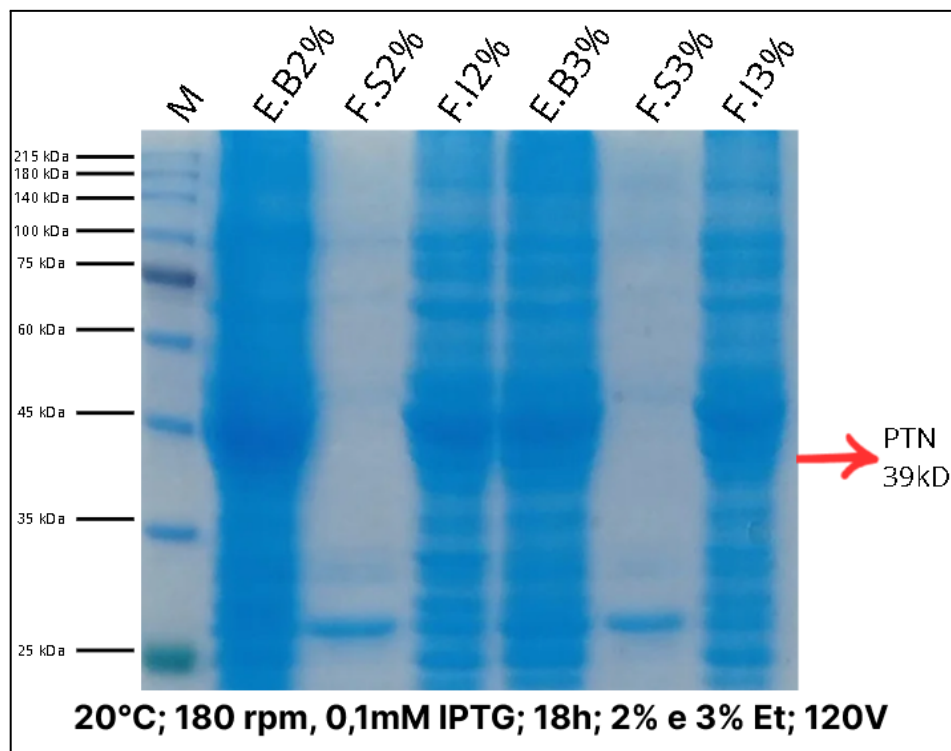
Um outro ponto que podemos destacar sobre estes géis é a tensão na qual foram submetidos durante a corrida, que neste caso foi de 140V. Esse aumento na tensão foi usado para avaliar o impacto da tensão no tempo da corrida (devido à maior tensão) e se isso teria um impacto na resolução do gel, como é mostrado em alguns trabalhos que também avaliaram a tensão nas corridas em SDS-PAGE (KOSHKINA *et al.*, 2023).

Tendo em vista que a indução de 6 horas e 18 horas tiveram resultados semelhantes, optamos por seguir com 18 horas de indução por questão de praticidade. Com isso, foi testada uma indução para comparar este tempo de indução com um tempo maior, de 20 horas, conforme mostra a figura 9. Podemos observar que a indução de 18 horas apresenta uma quantidade maior de proteínas na fração solúvel, incluindo as proteínas próximas ao tamanho alvo de 39 kDa.

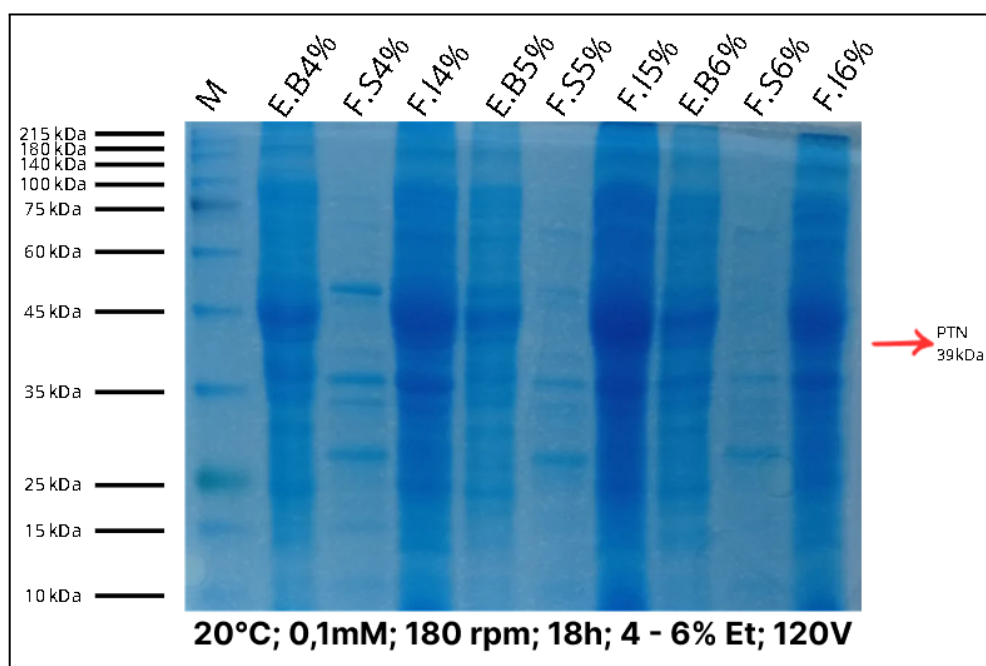


**Figura 9 - Resultado da indução a 18h e 20h:** A indução foi feita a 20°C, 180 rpm, 0.1mM IPTG. A corrida no gel de poliacrilamida foi feita a uma tensão de 120V. M: Marcador; E.B: Extrato Bruto; F.S: Fração Solúvel; F.I: Fração Insolúvel (corpo de inclusão).

Por fim, foram realizadas novas induções para testar o efeito da adição de Etanol junto ao IPTG. Estudos mais recentes vêm abordando essa estratégia para amplificar a expressão de proteínas, sob o argumento de que o etanol, sendo uma molécula anfipática, pode alterar a estrutura e permeabilidade da membrana celular, estresse oxidativo, conformação de enzimas e macromoléculas, ao passo que vários destes fenômenos afetam a replicação do DNA, levando ao aumento de sua síntese e, conseqüentemente, no aumento da sua expressão com a adição do indutor (BASU; PODDAR, 1994; CHHETRI; KALITA; TRIPATHI, 2015; INGRAM; BUTTKE, 1985). No entanto, nos nossos testes o efeito do etanol foi o oposto, levando a uma expressão bem baixa de proteínas solúveis, conforme mostram as figuras 10-A e 10-B. Uma possível causa para esse contraste no resultado em relação à literatura está no protocolo do experimento, onde alguns adicionam o etanol durante a pré-expressão, enquanto a cultura está crescendo até atingir a DO ideal e então adicionar também o IPTG para dar início à expressão, enquanto outros protocolos (como o que foi utilizado no presente estudo), realiza a adição do etanol junto do IPTG no momento de dar início à indução.



**Figura 10-A - Resultado da indução com etanol:** A indução foi feita a 20°C, 90 rpm, 0.1mM IPTG, durante 18 horas de indução e com adição de Etanol na concentração de 2% e 3% (do volume final). A corrida no gel de poliacrilamida foi feita a uma tensão de 120V. M: Marcador; E.B: Extrato Bruto; F.S: Fração Solúvel; F.I: Fração Insolúvel (corpo de inclusão).



**Figura 10-B - Resultado da indução com etanol:** A indução foi feita a 20°C, 90 rpm, 0.1mM IPTG, durante 18 horas de indução e com adição de Etanol na concentração de 4%, 5% e 6% (do volume final). A corrida no gel de poliacrilamida foi feita a uma tensão de 120V. M: Marcador; E.B: Extrato Bruto; F.S: Fração Solúvel; F.I: Fração Insolúvel (corpo de inclusão).

Uma variável importante que não foi levada em consideração neste trabalho foi o controle do pH nos experimentos de indução. A literatura aponta que culturas onde o pH não é devidamente controlado têm um aumento na produção de corpos de inclusão, uma vez que um pH muito alto ou muito baixo pode levar à desnaturação de proteínas, expondo regiões hidrofóbicas e podendo levar à agregação, além de afetar na atividade de chaperonas que atuam no dobramento das proteínas ou ainda ter um efeito sobre as cargas superficiais das proteínas, ocasionando uma interação eletrostáticas entre as moléculas e resultando na agregação (STRANDBERG; ENFORS, 1991; CASTELLANOS-MENDOZA *et al.*, 2014).

## 6. CONCLUSÕES:

Dentre as induções que foram feitas, considerando diferentes variáveis que influenciam direta ou indiretamente na obtenção das proteínas na sua forma solúvel, observamos que o cultivo a 20 °C, utilizando uma rotação de 180 rpm durante um período de 18 horas e com a adição de indutor a uma concentração mais baixa, cerca de 0,1mM, foi onde obtivemos um resultado mais satisfatório. Infelizmente por falta de tempo hábil, não foi possível otimizar a purificação das proteínas, que foi feita somente para o cálculo do peso molecular aproximado da proteína de interesse. O impacto da adição de etanol na cultura não foi coerente com outros trabalhos semelhantes encontrados na literatura, provavelmente pela utilização de um protocolo e metodologia diferente, fazendo-se necessários novos testes, com outros métodos, para que se possa ter uma definição do impacto do etanol na indução da expressão. Além disso, por não ter sido feito o controle do pH durante as induções é possível que a solubilidade geral das proteínas nas induções tenha sido afetada de alguma forma e este parâmetro precisa ser monitorado em trabalhos futuros. Outro ponto a se destacar é que devido a falta de tempo hábil, os parâmetros não foram testados em experimentos isolados, ou seja, houveram induções onde estava sendo modificado mais de um parâmetro, fazendo com que as mudanças na solubilidade não sejam atribuídas diretamente a um único fator.

Apesar destas limitações neste trabalho, os resultados são bastante satisfatórios para os estudos que estão em andamento no LAPEM (Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular), na UFV, onde vários trabalhos envolvendo a LbSRPK como alvo farmacológico estão sendo desenvolvidos. Os resultados obtidos no presente estudo servem como um norteador para futuras induções, em escalas bem maiores, com a finalidade de obter uma quantidade muito maior de proteínas na fração solúvel, de modo que possibilitem estudos posteriores com esta proteína e novas estratégias de intervenção sejam sintetizadas nesta busca de alcançar novos fármacos eficientes para o tratamento de Leishmanioses.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AMÓRA, S. S. A. *et al.* Control of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) leishmaniasis vectors. *Neotropical Entomology*, v. 38, p. 303–310, 1 jun. 2009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/ne/a/t66pjwt5NLZVQsvHyNjjNVQt/?lang=en>>. Acesso em: 28 set. 2022.

ASSIMINA, Z.; CHARILAOS, K.; FOTOULA, B. *Leishmaniasis: An Overlooked Public Health Concern*. [S.l: s.n.], 2014. Acesso em: 10 set. 2024.

AUBOL, B. E.; ADAMS, J. A. Recruiting a Silent Partner for Activation of the Protein Kinase SRPK1. *Biochemistry*, v. 53, n. 28, p. 4625–4634, 10 jul. 2014. Acesso em: 7 jun. 2024.

BASU, T.; PODDAR, R. K. Effect of ethanol on *Escherichia coli* cells. Enhancement of DNA synthesis due to ethanol treatment. *Folia Microbiologica*, v. 39, n. 1, p. 3–6, fev. 1994.

CASTELLANOS-MENDOZA, A. *et al.* Influence of pH control in the formation of inclusion bodies during production of recombinant sphingomyelinase-D in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, v. 13, n. 1, 12 set. 2014.

CHHETRI, G.; KALITA, P.; TRIPATHI, T. An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. *MethodsX*, v. 2, p. 385–391, 2015.

CHRUNYKSP, B. *et al.* Inclusion Body Formation and Protein Stability in Sequence Variants of Interleukin-1 $\beta$ . *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, n. 24, p. 1593, 9 abr. 1993. Acesso em: 19 ago. 2024.

FAIZO, A. A. A. SRPIN340, a cellular serine arginine protein kinases (SRPK) inhibitor, as a potential therapeutic for HPV16 infection - Enlighten Theses. *Gla.ac.uk*, 2019. Disponível em: <<https://theses.gla.ac.uk/74323/>>. Acesso em: 10 set. 2024.

FERGUSON, F. M.; GRAY, N. S. Kinase inhibitors: the road ahead. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 17, n. 5, p. 353–377, 16 mar. 2018.

GHOSH, G.; ADAMS, J. A. Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases. *The FEBS journal*, v. 278, n. 4, p. 587–97, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21205204>>. Acesso em: 20 ago. 2019.

GOMES, L.; MONTEIRO, G.; MERGULHÃO, F. The Impact of IPTG Induction on Plasmid Stability and Heterologous Protein Expression by Escherichia coli Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 2, p. 576, 16 jan. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7013871/>>.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 36, n. 6, p. 1089–1098, 18 set. 2015. Acesso em: 26 abr. 2024.

*HisTrap FF Crude Instructions*. [S.l: s.n.], [S.d.]. Disponível em: <[https://www.scientificlabs.co.uk/handlers/libraryFiles.ashx?filename=Manuals\\_1\\_11000458\\_A.PDF](https://www.scientificlabs.co.uk/handlers/libraryFiles.ashx?filename=Manuals_1_11000458_A.PDF)>. Acesso em: 8 maio 2024.

HWANG, D.-K.; CHO, J.-Y.; CHAE, Y.-K. Recombinant Expression and Purification of Functional XorII, a Restriction Endonuclease from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Microbiology*, v. 45, n. 2, p. 175–178, 2007. Disponível em: <<https://koreascience.kr/article/JAKO200734514774018.page>>. Acesso em: 26 abr. 2024.

INÁCIO, S. *Efeito do inibidor de serine arginine protein kinases (SRPKS) SRPIN340 e derivados em células murinas de câncer de mama metastático*. Disponível em: <<https://locus.ufv.br/items/22ea543d-6e4e-47cc-a6e4-82a18980bcb5>>. Acesso em: 10 set. 2024.

INGRAM, L. O.; BUTTKE, T. M. *Effects of Alcohols on Micro-Organisms*. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065291108602945>>.

JHAMB, K.; SAHOO, D. K. Production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*: Effects of process conditions and chaperone co-expression on cell growth and production of xylanase. *Bioresource Technology*, v. 123, p. 135–143, nov. 2012. Acesso em: 11 jul. 2024.

KOSHKINA, M. K. *et al.* Speeding up SDS-PAGE: theory and experiment. *Electrophoresis*, 19 abr. 2023.

LARENTIS *et al.* Influence of induction conditions on the expression of carbazole dioxygenase components (CarAa, CarAc, and CarAd) from *Pseudomonas stutzeri* in recombinant *Escherichia coli* using experimental design. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 38, n. 8, p. 1045–1054, 17 out. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jimb/article/38/8/1045/5994408>>. Acesso em: 19 ago. 2024.

LARENTIS, A. L. *et al.* Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. *BMC research notes*, v. 7, p. 671, 25 set. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25252618>>.

LEOPOLDO, J. R. *AS SERINE-ARGININE PROTEIN KINASES (SRPK'S) COMO POTENCIAL ALVO FARMACOLÓGICO NO TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)*. [S.l: s.n.], ago. 2022. Acesso em: 7 jun. 2024.

MIERENDORF, R. C. *et al.* Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System. *Methods in Molecular Medicine*, v. 13, p. 257–292, 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21390849/>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR Brasília -DF 2017* MINISTÉRIO DA SAÚDE. [S.l: s.n.], 2017. Disponível em:

<[https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar.pdf](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf)>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. [S.l: s.n.], 2014. Disponível em: <[https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_visce ral\\_1edicao.pdf](https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visce ral_1edicao.pdf)>.

MINUZZO, E. A. DE S. *et al.* EFEITOS ADVERSOS DA ANFOTERICINA B CONTRAPONDO- SE À ADESÃO AO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 26, n. S1, 1 jan. 2022.

Disponível em:

<<https://www.bjid.org.br/en-efeitos-adversos-da-anfotericina-b-articulo-S1413867021004384>

>. Acesso em: 7 jun. 2024.

MOREIRA, D. S.; MURTA, S. M. F. Involvement of nucleoside diphosphate kinase b and elongation factor 2 in *Leishmania braziliensis* antimony resistance phenotype. *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, dez. 2016. Acesso em: 9 maio 2020.

NOVAGEN. *pET System Manual 11th*. Disponível em:

<<https://pt.scribd.com/document/3986983/pET-System-Manual-11th>>. Acesso em: 10 set.

2024.

PIMENTEL, D. C. *et al.* First evidence of a serine arginine protein kinase (SRPK) in *leishmania braziliensis* and its potential as therapeutic target. *Acta Tropica*, v. 238, p. 106801, fev. 2023. Acesso em: 10 set. 2024.

PORTAL, D. *et al.* Trypanosoma cruzi TcSRPK, the first protozoan member of the SRPK family, is biochemically and functionally conserved with metazoan SR protein-specific kinases. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 127, n. 1, p. 9–21, mar. 2003. Acesso em: 12 ago. 2024.

RAI, M.; PADH, H. Expression systems for production of heterologous proteins. *Current Science*, v. 80, n. 9, p. 1121–1128, 2001. Disponível em:

<<https://www.jstor.org/stable/24105768>>.

RIBEIRO, M. *FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS DOUTORADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS AVALIAÇÃO DAS REAÇÕES ADVERSAS AO ANTIMONIATO DE MEGLUMINA EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA ASSISTIDOS NO INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS*. [S.l: s.n.], 2019. Acesso em: 7 jun. 2024.

RIGGS, P. D. Overview of Protein Expression Vectors for *E. coli*. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, v. 17, n. 1, 21 ago. 2018. Acesso em: 23 abr. 2024.

ROSA, M.; ROBERTS, C. J.; RODRIGUES, M. A. Connecting high-temperature and low-temperature protein stability and aggregation. *PLOS ONE*, v. 12, n. 5, p. e0176748, 4 maio 2017.

SAMBROOK, ., FRITSCH, E. R., & MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SARAVIA, N. G. *et al.* Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection—reactivation or reinfection? *The Lancet*, v. 336, n. 8712, p. 398–402, ago. 1990. Acesso em: 29 jun. 2021.

SATOSHI MOROOKA *et al.* Identification of a Dual Inhibitor of SRPK1 and CK2 That Attenuates Pathological Angiogenesis of Macular Degeneration in Mice. *Molecular Pharmacology*, v. 88, n. 2, p. 316–325, 20 maio 2015. Disponível em: <<https://molpharm.aspetjournals.org/content/88/2/316.short>>. Acesso em: 10 set. 2024.

SECRETARIA DE SAÚDE DO PARANÁ. *Leishmanioses*. Disponível em: <<https://www.saude.pr.gov.br/Pagina/Leishmanioses#:~:text=Leishmaniose%20Tegumentar%20>>. Acesso em: 3 set. 2024.

SHEPARD, P. J.; HERTEL, K. J. The SR protein family. *Genome Biology*, v. 10, n. 10, p. 242, 2009.

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, abr. 2005. Acesso em: 10 jul. 2024.

STRANDBERG, L.; ENFORS, S. O. Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 6, p. 1669–1674, jun. 1991. Acesso em: 3 maio 2022.

STUDIER, F. WILLIAM.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, v. 189, n. 1, p. 113–130, maio 1986. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283686903852>>.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; MEENA, L. P. Leishmaniasis: treatment, drug resistance and emerging therapies. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, v. 7, n. 1, p. 1–10, 5 dez. 2018. Acesso em: 16 dez. 2019.

TEIXEIRA, L. F. *Serine-arginine protein kinases (SRPKs) como potencial alvo de fármacos em Leishmania braziliensis*. Disponível em: <<https://locus.ufv.br/items/7cc6a913-2872-4c59-b2c6-f8e9c19826ae>>. Acesso em: 12 ago. 2024.

TOKSOY, E.; ÖNSAN, Z. Í.; KIRDAR, B. High-level production of Taq I restriction endonuclease by three different expression systems in Escherichia coli cells using the T7 phage promoter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, n. 2-3, p. 239–245, 1 jul. 2002. Acesso em: 26 fev. 2022.

TORRES, F. D. Canine leishmaniasis in the Americas: etiology, distribution, and clinical and zoonotic importance. *Parasites & vectors*, v. 17, n. 1, 30 abr. 2024.

VALLEJO, L.; RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*, 2 set. 2004. Acesso em: 10 jul. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Leishmaniasis*. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>.