

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ELISA ALVES MESSIAS SILVA

Expressão de uma serinoprotease de *Crotalus durissus collilineatus* em células de mamíferos e avaliação da sua atividade citotóxica sobre diferentes linhagens tumorais.

Uberlândia

Dezembro/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Expressão de uma serinoprotease de *Crotalus durissus collilineatus* em células de mamíferos e avaliação da sua atividade citotóxica sobre diferentes linhagens tumorais.

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientador: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Renata Santos Rodrigues

Co-Orientador: Matias Eliseo Melendez

Uberlândia

Dezembro/2018

Expressão de uma serinoprotease de *Crotalus durissus collilineatus* em células de mamíferos e avaliação da sua atividade citotóxica sobre diferentes linhagens tumorais.

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Uberlândia, 07 de Dezembro de 2018

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Santos Rodrigues (UFU/MG)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Veridiana de Melo Rodrigues Avila (UFU/MG)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Johara Boldrini França (UVV/ES)

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	05
1.1	Câncer e Toxinas com potencial terapêutico .....	05
1.2	Serpentes.....	07
1.2.1	Classe Reptilia .....	07
1.2.2	Serpentes peçonhentas no Brasil.....	07
1.3	<i>Crotalus</i> .....	08
1.4	Acidentes ofídicos .....	08
1.5	Toxinas presentes na peçonha Crotálica.....	09
1.6	Serinoproteases .....	10
2	JUSTIFICATIVA.....	10
3	OBJETIVOS.....	11
1.7	Objetivos gerais .....	11
1.8	Objetivos específicos .....	11
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	11
4.1	Obtenção do material biológico.....	11
4.2	Clonagem.....	12
4.3	Transfecção transiente do plasmídeo pCI-Neo_Serino construído na linhagem CHO-K1 .....	14
4.4	Confirmação da expressão da serinoprotease.....	15
4.5	Ensaio de viabilidade (MTS) .....	16
4.6	Individualização de clones por Cell Sorting.....	16
4.7	Apoptose.....	17
4.8	Análises estatísticas .....	18
5	RESULTADOS .....	18
6	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO .....	33
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Nas últimas décadas, trabalhos relatando a ação de toxinas ofídicas com potencial terapêutico têm aumentado significativamente e diversos novos compostos vêm sendo testados, apresentando melhoria em algumas patologias, principalmente sobre alguns tipos de cânceres. Levando em consideração o aumento global dos casos de câncer, se faz necessária a pesquisa de alternativas para inibir a progressão tumoral, bem como o desenvolvimento de fármacos eficientes. Algumas toxinas ofídicas isoladas ou mesmo recombinantes vêm sendo uma boa alternativa para o tratamento de células tumorais. Dentre uma gama de toxinas presentes na peçonha de *Crotalus durissus collilineatus* estão as serinoproteases, que atuam sobre proteínas plasmáticas associadas à via da hemostasia como um todo. E como as peçonhas de serpentes são uma vasta fonte de biomoléculas farmacologicamente ativas e, apesar do potencial de exploração, há poucos estudos relativos à caracterização biológica de serinoproteases com ação antitumoral.

**OBJETIVO:** O objetivo principal deste trabalho foi realizar a clonagem e expressão de uma serinoprotease presente na peçonha de *Crotalus durissus collilineatus* e avaliar seu potencial terapêutico em algumas linhagens derivadas de tumores de cabeça e pescoço, câncer de mama e pulmão.

**MATERIAIS E MÉTODOS:** A sequência da serinoprotease foi inserida no plasmídeo de expressão pCI-Neo. A expressão da proteína recombinante foi avaliada por Western Blot e o potencial da linhagem construída expressando a proteína de interesse foi testada em linhagens celulares derivadas de tumores de cabeça e pescoço, além de linhagens derivadas de mama e pulmão por técnicas como MTS e apoptose.

**RESULTADOS:** Foi confirmada pelo ensaio de Western Blot a expressão proteica da serinoprotease na linhagem construída a partir de uma transfecção com o plasmídeo de expressão pCI-Neo contendo a sequência da serinoprotease, além de ter sido avaliado o efeito da mesma acerca da viabilidade das linhagens tumorais de cabeça e pescoço, mama e pulmão. Apesar dos ensaios preliminares feitos a partir de uma transfecção transiente do plasmídeo de expressão pCI-Neo contendo a serinoprotease ter mostrado uma diminuição da viabilidade celular na linhagem VU147T, quando a linhagem foi estabelecida (pCI-Neo\_Serino clone 5), a mesma não apresentou significância estatística em nenhuma das linhagens tumorais que foram tratadas com o sobrenadante da linhagem construída com expressão constitutiva da serinoprotease recombinante.

**CONCLUSÃO:** Poucos estudos são encontrados na literatura que relatam a ação destas proteases sobre células tumorais. Dessa forma, os estudos apresentados neste trabalho revelaram a eficiência na produção da serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus*, porém são necessários mais ensaios para compreender o mecanismo de ação destas proteases frente às células tumorais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Serinoprotease, *Crotalus durissus collilineatus*, Viabilidade celular, Linhagens tumorais.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** In the last decades, studies reporting the action of ophidian toxins with therapeutic potential have increased significantly and several new compounds have been tested, showing improvement in some pathologies, mainly on some types of cancers. Cancer of the head and neck is known as having anatomical features that define malignant tumors of the upper digestive tract. Taking into account the global increase in cancer cases, it is necessary to search for alternatives to inhibit tumor progression, as well as the development of efficient drugs. Some isolated or even recombinant toxins have been found to be a good alternative for the treatment of tumor cells. Among a range of toxins present in the venom of *Crotalus durissus collilineatus* are serine proteases, which act on plasma proteins associated with the blood coagulation pathway. Snake venoms are a vast source of pharmacologically active biomolecules. Despite the potential for exploration, there are few studies on the biological characterization of serine proteases with antitumor action. **AIM:** The objective of this work was cloning and expression of a serine protease present in the venom of *Crotalus durissus collilineatus* and evaluate its therapeutic potential in some cell lines derived from head and neck tumors, breast and lung cancer. **MATERIALS AND METHODS:** The sequence of serine protease was inserted into the pCI-Neo expression plasmid. The potential of the cell line constructed expressing the protein was tested in cell lines derived from head and neck tumors, as well as lineages derived from breast and lung by techniques such as Western Blot, MTS and apoptosis. **RESULTS:** The expression of serine protease was confirmed by the Western blot assay, which was constructed from a transfection with the pCI-Neo expression plasmid containing the sequence of serine protease, and the effect of the same on the viability of the lineages tumors of the head and neck, breast and lung. Although preliminary assays made from a transient transfection of the pCI- Neo expression plasmid containing the serinoprotease showed a decrease in cell viability in the VU147T cell line. when the cell line was established, it did not present statistical significance in any of the tumor lines that were treated with the supernatant of the cell line with constitutive expression of the serinoprotease. **CONCLUSION:** few studies are found in the literature that report the action of these proteases on tumor cells. Thus, the studies presented in this study revealed the efficiency in the production of the recombinant serine protease of *C. d. collilineatus*, but further testing is needed to understand the mechanism of action of these proteases against tumor cells.

**KEY WORDS:** Serine protease, *Crotalus durissus collilineatus*, Cell viability, Tumor cell lines

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer e Toxinas com potencial terapêutico

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública mundial, com elevadas taxas de mortalidade. Em 2012, foram registrados aproximadamente 12 milhões de novos casos e 8 milhões de mortes associadas ao câncer (WHO, 2015). De acordo com as estimativas recentes, no presente ano, foram registrados 18 milhões de casos novos e 9 milhões de mortes associadas ao câncer (WHO, 2018). Para o Brasil, no biênio de 2018 – 2019 estimam-se aproximadamente 600 mil casos novos de câncer por ano (Inca, 2018).

Atualmente, as neoplasias são classificadas de acordo com a sua localização primária, sendo: cavidade oral; esôfago; estômago; cólon e reto; laringe; traqueia, brônquios e pulmões; melanoma maligno de pele; outras neoplasias malignas da pele; mama; colo do útero; corpo do útero; ovário; próstata; bexiga; sistema nervoso central; glândula tireoide; linfoma de Hodgkin; linfoma de não Hodgkin; e leucemias. (Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil 2015)

Os tumores de cabeça e pescoço são aqueles que afetam a região nasal, faringe, cavidade oral, sinos paranasais e laringe (Kang *et al.*, 2015). Estudos comprovam que o uso do tabaco, álcool e infecções por HPV geram uma predisposição ao câncer de cabeça e pescoço (Oliveira-Silva *et al.*, 2016). Esse tipo de tumor afeta cerca de 650 mil pessoas por ano, passando a ser a sexta neoplasia mais frequente, além de ter registrado 350 mil casos de óbito no mundo (Argiris *et al.*, 2008; Bray *et al.*, 2013; Torre *et al.*, 2015).

De acordo com a distribuição proporcional de tipos de câncer por 100 mil habitantes estimados para 2016 no Brasil, o câncer de próstata é o que mais acomete os homens, com mais de 61 mil casos, totalizando 28,6%; seguido do câncer de traqueia, brônquio e pulmão com 17 mil casos, colón e reto com 16 mil casos, estômago com 12 mil casos e, na sequência, o câncer de cavidade oral, uma das localizações de neoplasias de cabeça e pescoço, totalizando 11 mil novos casos em homens no ano de 2016 (Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil 2015).

As proporções de incidência de casos de câncer estimados em 2016 para o sexo feminino é diferente, sendo o câncer de mama o que mais acomete com 57 mil novos casos totalizando 28%, cólon e reto com 17 mil, colo do útero com 16 mil e traqueia, brônquio e pulmão estimando 10 mil novos casos. O câncer de cabeça e pescoço em mulheres não está entre os 10 tipos de câncer com maior incidência no país, pois sua estimativa gira em torno de 4 mil ocorrências para o ano de 2016 (Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil 2015).

A partir de análises de dados de mortalidade, durante os anos de 2010 até 2014, 71 mil pessoas do sexo masculino foram a óbito devido ao câncer de traqueia, brônquio e pulmão, seguido de 67 mil óbitos por câncer de próstata e levando a óbito mais de 9 mil homens por câncer na cavidade oral. O tipo de câncer que levou mais mulheres a óbito foi o de mama, totalizando mais de 68 mil casos. A taxa de mortalidade do sexo feminino devido ao câncer na cavidade oral foi maior que 3 mil casos (Inca, 2014). A estimativa do Inca para o biênio de 2018 e 2019 é de aproximadamente 15 mil casos novos de câncer de cavidade oral. Devido a alta expressividade estatística, o câncer de cavidade oral se tornou o 5º mais frequente em homens e o 4º mais frequente na região Sudeste (Inca, 2018).

O tratamento padrão para a maioria dos pacientes geralmente inclui uma combinação de quimioterapia e radioterapia, no entanto, alguns medicamentos quimioterápicos podem, também, causar danos em células de outros órgãos, como coração, rins, bexiga, pulmões e sistema nervoso.

Levando em consideração o aumento global dos casos de câncer, se faz necessária a busca por métodos alternativos para inibir a progressão tumoral, bem como o desenvolvimento de fármacos eficientes. Uma das alternativas está na exploração de recursos naturais como toxinas ofídicas como potencial terapêutico, levando ao



desenvolvimento de novos tratamentos antitumorais que podem apresentar efeitos colaterais e toxicidade inferiores quando comparados com os métodos de tratamento atuais (Takacs e Nathan, 2014; Mukherjee *et al.*, 2015).

Nas últimas décadas, trabalhos relatando a ação de toxinas ofídicas com potencial terapêutico têm aumentado significativamente e diversos novos compostos vêm sendo testados, apresentando melhoria em algumas patologias, como hipertensão, doenças autoimunes, disfunção erétil, diabetes e câncer (Rebello Horta *et al.*, 2016).

Azevedo e colaboradores caracterizaram a atividade antitumoral da BnSP-6, uma PLA<sub>2</sub> isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*. Essa PLA<sub>2</sub> Lys-49, foi capaz de inibir a adesão e migração de células MDA-MB-231 (câncer de mama), uma linhagem de células triplo negativa e altamente metastática, além disso, BnSP-6 foi capaz de estimular a autofagia promovendo a formação de vacúolos autofágicos e induzindo a célula a morte celular programada por apoptose. (Azevedo *et al.*, 2016)

Apesar deste potencial de exploração, há poucos estudos relativos à caracterização antitumoral de serinoproteases. Assim, faz-se necessário aprofundar os conhecimentos do potencial terapêutico dessas moléculas.

## **1.2 Serpentes**

### **1.2.1 Classe Reptilia**

No mundo atual, são conhecidas cerca de 10.700 espécies de répteis. Enquanto no Brasil, podemos destacar a existência de aproximadamente 795 delas. Desse total, 753 espécies fazem parte da ordem Squamata, onde 405 fazem parte da subordem serpentes. Se consideradas as subespécies, a diversidade de répteis encontradas no país é ainda maior, chegando a 842 espécies e subespécies (Herpetologia Brasileira, 2018).

### **1.2.2 Serpentes peçonhentas no Brasil**

As serpentes peçonhentas fazem parte da família Viperidae. As serpentes desta família exibem um sistema de inoculação de peçonha considerado de alto grau de

sofisticação, apresentando uma glândula pós-orbital associada a presas retrateis na porção frontal, por onde a peçonha é inoculada na vítima devido à compressão de diversos músculos chamados de acessórios à glândula (França, 2013). Até o presente momento, foram descritas 31 espécies e 6 subespécies desta família no Brasil. (Herpetologia Brasileira, 2018)

As serpentes são subdivididas em subfamílias, sendo a subfamília crotalinae diferenciada das outras graças à presença da fosseta loreal, um órgão termorreceptor que possibilita a detecção de presas endotérmicas. Ao todo, foram descritas 243 espécies pertencentes a esta subfamília em todo o mundo, (The Reptile Database, 2018) sendo que 37 desta categoria estão presentes no território brasileiro, pertencendo a 3 gêneros, *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus* (Grigg *et al.*, 2016).

### **1.3 *Crotalus***

O gênero foi originado no período médio cenozoico por volta de 20 milhões de anos atrás, compreendendo aproximadamente 47 espécies de serpentes (The reptile database, 2018), distribuídas principalmente na América do Sul, (The reptile database, 2018) até o Canadá. No Brasil, as cascavéis são classificadas em seis subespécies, *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus dryinas*, *Crotalus durissus ruruima*, *Crotalus durissus marajoensis* (Herpetologia Brasileira, 2018). A característica marcante das cascavéis é a presença do “guizo” na porção final da cauda, formado pela sobreposição de anéis de queratina que vibram quando a mesma se sente ameaçada (França, 2013).

### **1.4 Acidentes ofídicos**

As picadas de serpentes podem causar paralisia de órgãos, distúrbios de ordem hemorrágica, podendo ser letal. De acordo com dados da OMS são registrados aproximadamente 5,4 milhões de casos de picada de serpentes em todo o mundo, sendo que metade deles são registrados como envenenamento. Desse expressivo número, 130

mil são cadastrados como óbitos. A maioria desses acidentes ocorre em toda América Latina, Ásia e África. (WHO, 2018)

No Brasil, o Ministério da Saúde estimou para o ano de 2017 que, a cada 100 mil pessoas, 13.8 sofrem um acidente ofídico. O mesmo órgão registrou mais de 1.800 óbitos entre os anos 2000 e 2017. (Ministério da saúde, 2017)

### **1.5 Toxinas presentes na peçonha crotalica**

A partir de estudos comparativos de caracterização proteômica e antivenômica de subespécies *cascavella* e *collilineatus* pertencentes ao gênero *Crotalus*, é sabido que

A massa molecular das proteínas presentes na peçonha varia de 4 a 115 kDa,. Na peçonha de *C.d.collilineatus* foram identificadas algumas toxinas como: desintegrinas, fosfolipases A<sub>2</sub>, L-aminoácido oxidases, metaloproteinases, proteína secretada rica em cisteína (CRISPs), serinoproteinases, dentre outras.

A crotamina, um peptídeo catiônico com ação miotóxica, corresponde a aproximadamente 20% das proteínas totais da peçonha enquanto a crotoxina, um complexo de PLA<sub>2</sub> + crotapotina compreende 67% do total da peçonha (Boldrini-Franca *et al.*, 2010).

O resultado do estudo de transcriptoma da glândula de *Crotalus durissus collilineatus* mostrou que a toxina de maior abundância é a crotoxina, compreendendo 88% das toxinas (Boldrini-Franca *et al.*, 2009). A crotoxina é uma fosfolipase A<sub>2</sub> que é a principal responsável pelo pronunciado efeito neurotóxico, por conta de sua potente atividade de bloqueio da transmissão neuromuscular. É formada por duas subunidades, uma ácida, não tóxica e desprovida de ação enzimática; conhecida como crotoxina A (CA) ou crotapotina; e uma básica, tóxica com atividade enzimática; conhecida como crotoxina B (CB) (Boldrini-Franca *et al.*, 2009).

Além disso, os resultados do transcriptoma mostraram a proporção relativa das toxinas, evidenciando a crotoxina A (46%), crotoxina B (42%), metaloproteases (3%),

serinoproteases (2,5%) dentre outras toxinas (2,5%). (Boldrini-Franca *et al.*, 2015)

## 1.6 Serinoproteases

As serinoproteases de peçonhas de serpentes (SVSPs) são classificadas como Tripsina S1 de clã SA (Rawlings & Barrent, 2004), pois possuem estrutura semelhante à tripsina. As SVSPs são glicoproteínas com massa molecular variando entre 23 a 67 kDa catalisam uma ampla gama de reações que podem atuar em pontos distintos da via de coagulação, por ativação ou inibição específica de componentes envolvidos na agregação plaquetária, coagulação sanguínea e fibrinólise (Braud et al, 2000).

As serinoproteases de peçonhas de serpentes podem apresentar ação semelhante à trombina e por isso são conhecidas como enzimas *thrombin-like* por mimetizarem mecanismos de ação da trombina, como, quebrar as moléculas de fibrinogênio formando coágulos de fibrina (Fernandes, 2009). No entanto, estas SVSPs não são capazes de ativar o fator XIII da via de coagulação e por isso, os coágulos são denominados “frouxos” e instáveis (Castro et al, 2004).

Boldrini-França e colaboradores caracterizaram a serinoprotease nativa (rCollineina-1) e recombinante (rCollineina-1) da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*. As serinoproteases nativa e recombinante apresentaram efeitos semelhantes em ensaios de cinética enzimática, além de apresentarem uma alta estabilidade em diferentes temperaturas e pH (Boldrini-Franca *et al.*, 2009).

Dessa forma, tanto toxinas nativas como recombinantes podem ser utilizadas em aplicações terapêuticas podendo auxiliar no desenho de novos fármacos com ação antitumoral.

## 2. Justificativa

Sabe-se que a incidência de câncer tem aumentado significativamente ao longo dos anos e que o número de óbitos por câncer aumentou em 1 milhão desde a última estimativa feita pela organização mundial da saúde (WHO, 2012 ; WHO, 2018). Com o aumento global dos casos de câncer, faz-se necessárias pesquisas alternativas para inibir a progressão tumoral bem como

fármacos eficientes, gerando novos tratamentos antitumorais. Dessa forma, o uso de toxinas com potencial terapêutico tem aumentado nas últimas décadas e compostos vindos de animais peçonhentos vem sendo testados (Natesh et al., 2004; ;Hannon & Atchison, 2013). Entretanto, existem poucos trabalhos na literatura avaliando o potencial citotóxico das serinoproteases em linhagens tumorais. Tal toxina é capaz de degradar o fibrinogênio e inibir a coagulação sanguínea (Serrano Maroun, 2005). Sendo assim, o estudo da serinoprotease como potencial tumoral se torna pertinente, principalmente se a proteína recombinante estiver associada a tecnologia da expressão heteróloga, podendo produzir a toxina recombinante em larga escala sem que haja necessidade do manuseio do animal para a obtenção da toxina.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 - Objetivos Gerais**

Este trabalho propõe a clonagem e expressão de uma serinoprotease presente na peçonha de *Crotalus durissus collilineatus* e avaliar seu potencial terapêutico em algumas linhagens celulares derivadas de tumores de cabeça e pescoço, mama e pulmão.

#### **3.2 - Objetivos Específicos**

- Clonar e expressar uma serinoprotease presente na peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*;
- Realizar a confirmação da expressão da proteína recombinante por Western Blot;
- Avaliar a ação da toxina sobre a Viabilidade celular por 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS) sobre as seguintes linhagens tumorais: HCB289, HCB289++, SCC47, SCC2, VU147T, SCC25, MCF7 e A549.
- Avaliar a ação da toxina sobre apoptose nas linhagens HCB 289 e VU120T

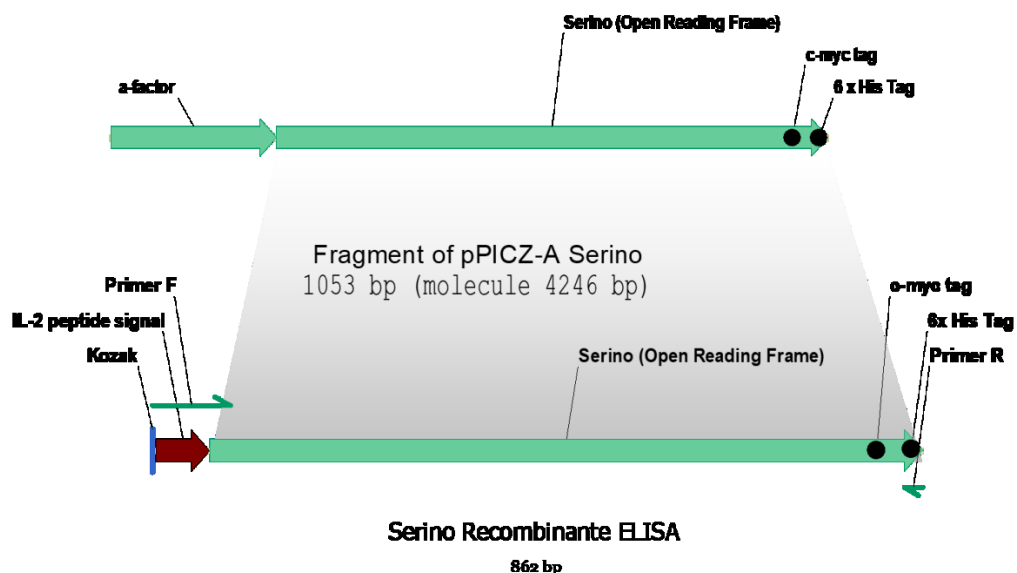
### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 - Obtenção do material biológico**

O plasmídeo contendo a serinoprotease de *Crotalus durissus collilineatus* utilizado neste trabalho foi doado pelo Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais – LABITOX da Universidade Federal de Uberlândia e Laboratório de Toxinas Animais – LTA da Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP- USP. O plasmídeo foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

## 4.2 - Clonagem

O clone contendo o cDNA que codifica a serinoprotease foi identificado na biblioteca da glândula de peçonha da serpente *C.d.collilineatus* (Boldrini-Franca *et al.*, 2009). A partir do plasmídeo pPICZ $\alpha$ A.collineinal (Boldrini-Franca *et al.*, 2015) o gene codificante da serinoprotease foi amplificado por PCR usando a enzima Phusion (Thermo Scientific) (Figura 1)



**Figura 1:** Representação do fragmento que foi retirado do plasmídeo pPICZ $\alpha$ A.collineinal (Boldrini-Franca *et al.*, 2015) usando primers específicos desenhados pelo nosso grupo de pesquisa, além da adição das sequências de Kozak e peptídeo sinal.

Para a realização da PCR, foram usados primers específicos

IL2\_SERINO\_F:CACCATGCGCCGCATGCAGCTGCTGCTGCTGATTGCGCTGA

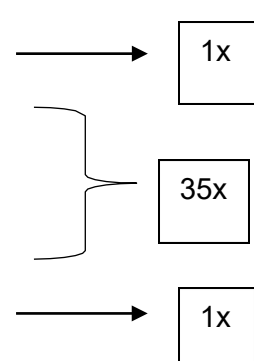
GCCTGGCGCTGGTGACCAACAGCGTCATTGGAGGAGATGAATGTAAC) e

Serino\_R (5' TCAATGATGATGATGATGATG) cujos volumes são descritos na tabela 1 e a ciclagem descrita na tabela 2.

Água	10,75 µL
GC Buffer	5 µL
dNTP (10uM)	0,5 µL
Primer F (10µM)	0,25 µL
Primer R (10µM)	0,25 µL
DNA (100 ng)	1 µL
DMSO	1,5 µL
Enzima (Phusion)	0,25 µL

**Tabela 2:** Ciclo da PCR usado para a amplificação da sequência de interesse

Temperatura (Celsius)	Tempo (Minutos)
98°C	3:00
98°C	0:30
65°C	1:00
72°C	1:00
72°C	10:00



The diagram to the right of the table illustrates the PCR cycle structure. It shows three boxes labeled '1x', '35x', and '1x' from top to bottom. A horizontal arrow points to the first '1x' box. A bracket on the left side of the '35x' box indicates that the three preceding rows (98°C 0:30, 65°C 1:00, and 72°C 1:00) are repeated 35 times. A horizontal arrow points to the final '1x' box.

Após a realização da PCR, o produto gerado pela reação foi aplicado em um gel de eletroforese 1% agarose.

O gene amplificado foi clonado no plasmídeo de expressão pCR-BluntII- TOPO (Thermo Scientific – Ref #450245) segundo recomendações do fabricante. Uma sequência de Kozak e um peptídeo sinal de exportação celular foram adicionados na extremidade 5' do gene da serinoprotease, com a finalidade de potencializar a expressão e secreção da proteína recombinante, respectivamente. O plasmídeo sequenciado pelo método de sanger denominado pCR\_Blunt\_Serino cuja, sua quantificação foi de 24ng/uL, foi submetido à digestão com as enzimas de restrição *XhoI* e *HindIII* para obtenção do fragmento de 862 pares de bases contendo extremidades coesivas, que possibilitará a clonagem usando a

enzima T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) usando 8 uL do DNA de interesse, 0,5 uL da enzima T4 DNA ligase, 1 uL do tampão da enzima e 0,5 uL do plasmídeo pCI-Neo (Promega), previamente linearizado e tratado com a enzima Klenow (Thermo Scientific). O Produto de PCR foi devidamente purificado segundo recomendações do fabricante do kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MN – Ref #740609.250). O protocolo de digestão enzimática consiste em fazer uma mistura com 3 uL do plasmídeo construído, 0,5 uL da enzima de interesse e 3uL do buffer R (*Thermo Scientific*) da enzima seguido do aquecimento da amostra durante 60 minutos a 37°C. Posteriormente, o plasmídeo resultante pCI-Neo\_Serino, foi utilizado pois, o plasmídeo de expressão pCI-Neo (promega) carrega a região promotora do citomegalovírus (CMV), que promove a expressão constitutiva das inserções de DNA clonados em células de mamíferos. A verificação da integridade das sequências codificantes foi feita por sequenciamento no sequenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), em ambas as orientações.

#### **4.3 - Transfecção transiente do plasmídeo pCI-Neo\_Serino construído na linhagem CHO-K1**

Para análises preliminares do potencial antitumoral da proteína recombinante de *C. d. collilineatus*, foi realizada uma transfecção transiente do plasmídeo pCI-Neo\_Serino pelo método de lipofecção com o reagente de transfecção Lipofectamina na linhagem celular CHO-K1 (BCRJ). Segundo o protocolo da empresa, inicialmente utiliza-se dois tubos: no primeiro são adicionados 125 uL de meio de cultura Optimem (Thermo Scientific), tamponado com bicarbonato de sódio, e suplementado com hipoxantina, timidina, piruvato de sódio, L-glutamina, oligoelementos, além de fatores de crescimento. Reagente de transfecção P3000 reagent (Thermo Scientific) , além do DNA de interesse. No segundo tubo, a lipofectamina é hidratada com 125 uL de meio de cultura Optimem (Thermo Scientific), tamponado com bicarbonato de sódio, e suplementado com hipoxantina, timidina, piruvato de sódio, L-glutamina, oligoelementos, além de fatores de



crescimento usada no tubo anterior. Foi usado para a transfecção o meio de cultura RPMI condicionado com 1% P/S e 10% SFB. A produção estava sob condições controladas de CO<sub>2</sub> (5%) e temperatura (37° C). Após 48 horas de transfecção o sobrenadante foi coletado para ser utilizado no ensaio de viabilidade celular e as células contendo as proteínas de interesse também foram coletadas para ensaios futuros.

#### 4.4 - Confirmação da expressão da serinoprotease

Após o ensaio de transfecção, as células contendo a proteína recombinante de *C. d. collilineatus* foram lavadas com PBS e soltas com cell scraper (BD Biosciences, cód. 353086) em tampão de lise contendo 50 mM de Tris (PH 7.6-8.0), 150 mM NaCl, 5 mM de EDTA, 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM de NaF, 10 mM de pirofosfato de sódio, 1% NP-40, 10 µg/mL de leupeptina, 10 µg/mL de aprotinina, 1 mM de DTT, 0,01 M de EDTA e 1 mM de PMSF. As células foram incubadas por 60 minutos no gelo. O conteúdo proteico foi quantificado por Bradford. A análise de Western blot foi realizada utilizando um gel padrão de 15% SDS- PAGE (acrilamida/ bis-acrilamida 29:1), levando 50 µg de proteína por canaleta. A corrida foi realizada em condições desnaturantes, a 90 volts, em gel 14 x 16 cm, por 2 horas. Após a eletroforese, as bandas proteicas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Amersham Protran supported 0,45 µm NC, GE Healthcare) utilizando-se tampão com 25 mM de tris, 193 mM de glicina e 20% de metanol. A transferência foi feita em cuba semi-seca (Trans-Blot Turbo- Biorad) por 30 minutos, sendo a amperagem estabelecida em função da área da membrana. Após a transferência das bandas de proteínas, a membrana de nitrocelulose foi incubada por 45 minutos em uma solução constituída de leite em pó desnatado a 5%, em tampão TBS-T (Tris Buffered Saline, 10 mM de tris-HCl pH 7,4 e 0,9% de NaCl, Tween 0,2%), à temperatura ambiente sob agitação leve e depois, lavada duas vezes em tampão TBS-tween 0,2%, por 10 minutos. Foi usado o anticorpo Anti- HisTag (Abcam) com diluição de 1:250 em solução de Molico 5% + TBST e Anti-Mouse IgG (Sigma-Aldrich) como anticorpo secundário. A detecção das bandas foi feita por quimioluminescência (ECL, Westren Blotting detection reagentes, RPN2109; GE Healthcare, Piscataway, NJ) usando uma diluição de 1:1 e fotografadas posteriormente utilizando ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare).

#### 4.5 - Ensaios de citotoxicidade (MTS)

Para o ensaio de citotoxicidade nas linhagens celulares derivadas de cabeça e pescoço, mama e pulmão (HCB289, HCB289++, SCC47, SCC2, VU147T, SCC25, A549 e MCF7), foi escolhido para o experimento o uso do composto MTS (5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4,5-dimetiltiazolil)-3-(4-sulfofenil) tetrazólio). foi utilizado 100 uL do sobrenadante contendo a serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus*. O ensaio de viabilidade celular em solução aquosa, Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) foi realizado conforme descrito pelo fabricante. Para este ensaio,  $5 \times 10^3$  células foram semeadas em placas de 96 poços em triplicatas. Posteriormente, as células foram submetidas ao sobrenadante de células CHO-K1 controle ou contendo a serinoprotease recombinante, tanto da transfecção estável quanto da transfecção transiente de *C. d. collilineatus*. Após 48 horas de tratamento, com 100 uL de ambos os sobrenadantes em poços diferentes, foi adicionado o reagente MTS (90 uL de meio DMEM 10% SFB e 1%P/S + 10 uL do reagente MTS para cada poço) e posteriormente a realização da leitura da placa em leitora de ELISA (Varioskan Flash-Thermo scientific) a 490nm. Os dados foram obtidos e normalizados em relação à sobrevivência média das amostras não tratadas (controle). No ensaio, o composto é bio-reduzido pela succinato desidrogenase (enzima mitocondrial) pelas células viáveis ao produto formazan que é solúvel no meio de cultura. A quantidade de composto (MTS) metabolizado pelas células é diretamente proporcional ao número de células viáveis. (CORY et al, 1991)

#### 4.6 - Individualização de clones por Cell Sorting

As células CHO-K1 foram transfectadas com o plasmídeo de expressão pCI-Neo contendo a sequência de nucleotídeos codificantes para a serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus*. As células que englobaram o DNA de interesse geraram clones que foram selecionados posteriormente com adição de antibiótico (10 uL/mL) G418 cujo estoque 50 mg/mL (Sigma- aldrich), pois o plasmídeo pCI-Neo conferia resistência ao mesmo e foram isoladas pela técnica de single cell sorting. A técnica foi realizada no Laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, em colaboração com a pesquisadora Patrícia Vianna Bonini Palma. Para o ensaio foi usado o

equipamento FACSaria™ Fusion (BD Biosciences), que possibilitou o isolamento das populações celulares de acordo com o tamanho das células e sua complexidade. A população de células pCI-Neo\_Serino foi tratada com a técnica de A técnica foi realizada devido a necessidade de se isolar uma população de células que mais expressava a proteína de interesse, quantificar a produção das proteínas, além de possibilitar uma padronização da produção das proteínas para ensaios futuros.

#### **4.7 - Apoptose**

As células foram submetidas à marcação com anexina V (apoptose) e 7AAD utilizando o *PE Annexin V apoptosis detection kit 1 (BD Biosciences)*, conforme as recomendações do fabricante. Inicialmente, foram plaqueadas  $5 \times 10^5$  células das linhagens desejadas (HCB 289 e 93 VU120T). Após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura foi retirado e 2 mL do sobrenadante da produção da serinoprotease foi adicionado às culturas de célula. Após 48 horas, o sobrenadante foi coletado e as células aderidas na placa de cultura foram submetidas a desagregação pelo reagente Acutase. As células foram submetidas a um ciclo de centrifugação (1500 RPM durante 5 minutos em temperatura ambiente), seguido da adição dos reagentes do kit de apoptose *PE Annexin V apoptosis detection kit 1 (BD Biosciences)* e as mesmas foram avaliadas em citômetro de fluxo BD Accuri C6 cytometer (BD Biosciences)

#### **4.8 - Quantificação da produção da serinoprotease recombinante por ELISA**

Uma vez que a linhagem foi estabelecida, a mesma foi submetida a um ensaio de imunquantificação pelo método de ELISA seguindo recomendações do fabricante do kit His Tag ELISA Detection Kit (Genscript). Para o ensaio, foram plaqueadas  $2,5 \times 10^6$  células CHO-kl\_pCI-Neo\_Serino em triplicata. Após 48 horas de plaqueamento, foi coletado o sobrenadante e filtrado. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 50  $\mu$ L de cada amostra coletada e posteriormente submetidas à leitura da absorbância no valor de 450nm no Varioskan™ (Thermo Scientific).

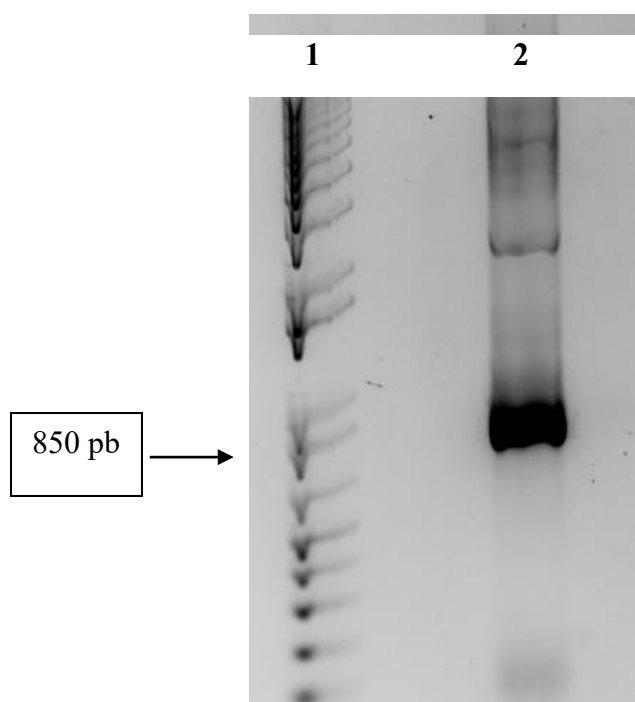
#### 4.9 - Análises estatísticas

Os resultados dos experimentos, quando não analisados na plataforma *IN Cell*, que possui software próprio, foram realizados utilizando-se o software *GraphPad Prism* versão 6.01. Para as comparações simples foi utilizado o teste *t* de Student. As diferenças entre os grupos foram testadas utilizando a análise de variância (ANOVA). Os resultados foram considerados significativos para  $p < 0,05$ .

### 5. RESULTADOS

#### 5.1 – Clonagem

Para a amplificação do gene codificante da serinoprotease de *C. d. collilineatus*, foram desenhados oligonucleotídeos específicos e utilizada a enzima Phusion para clonagem da proteína de interesse com a ciclagem mostrada na Tabela 2. Após amplificação das amostras por PCR, foi observado em gel de agarose a 1% um fragmento de aproximadamente 756pb, tamanho correspondente a serinoproteases, mostrando assim que o gene foi eficientemente clonado (Figura 1).

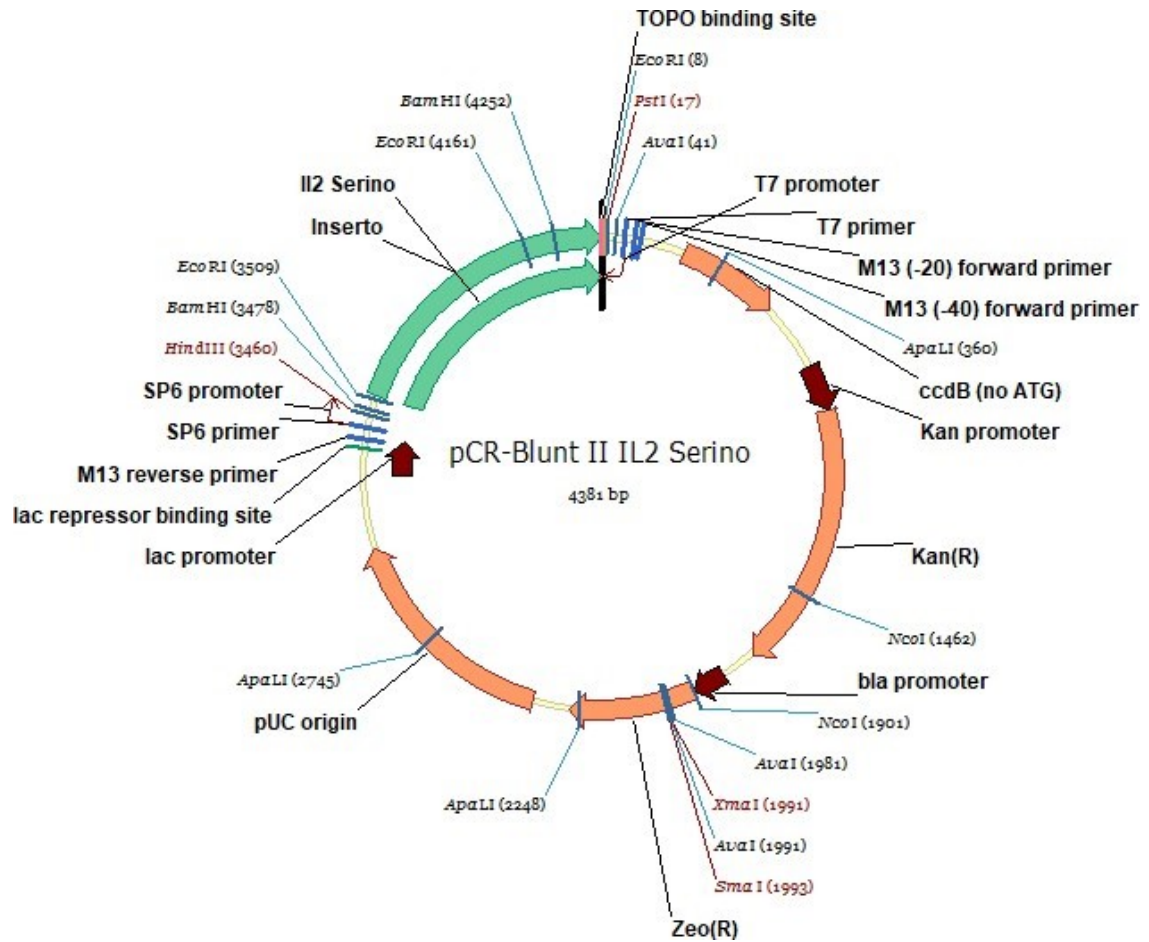


**Figura 1:** Amplificação do gene correspondente a serinoprotease de *C. d. collilineatus* (~862pb). O gene foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pPICZαA.collineina1, utilizando primers específicos. 1- padrão de pares de bases. *Track 1kb plus DNA ladder (Thermo Scientific)*. 2- produto de PCR contendo o

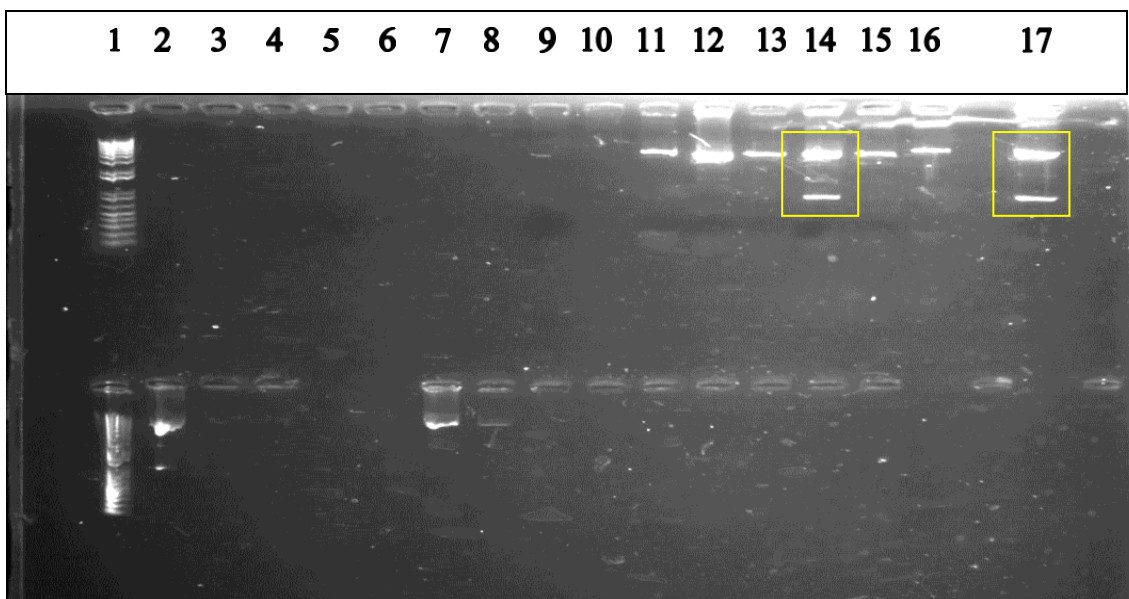
gene que codifica a serinoprotease na forma madura.

Após a amplificação do gene de interesse, o vetor de expressão pCR-BluntII-TOPO (Thermo Scientific) foi escolhido com a finalidade de potencializar a expressão e secreção da proteína recombinante. A figura 2 apresenta o mapa circular do vetor de

expressão pCR\_Blunt\_Serino e o gel de agarose a 1% do plasmídeo pCR-BluntII-TOPO digerido com a enzima de restrição BamHI contendo o gene de interesse (Figura 2).

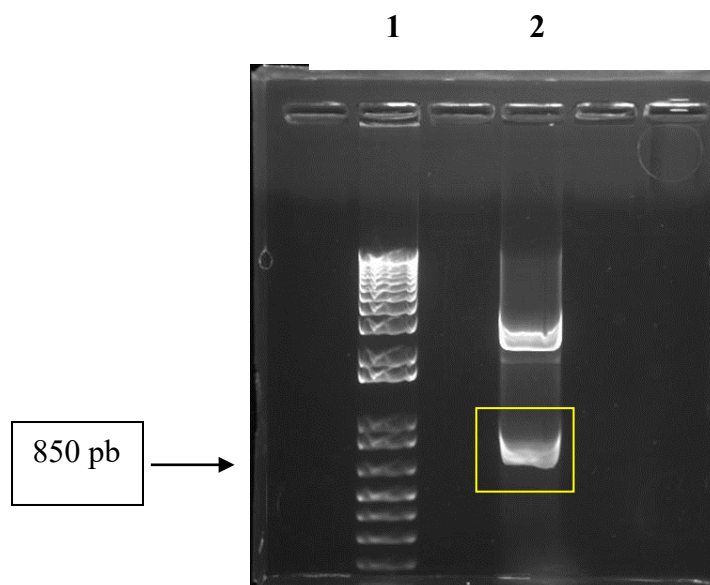


**Figura 2:** Mapa circular do vetor de expressão pCR-Blunt II contendo o gene da serinoprotease de *C. d. collilineatus*. Retirado do programa de edição de plasmídeos Vector NTI.invitrogen [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/zcroblunttopo\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/zcroblunttopo_man.pdf).



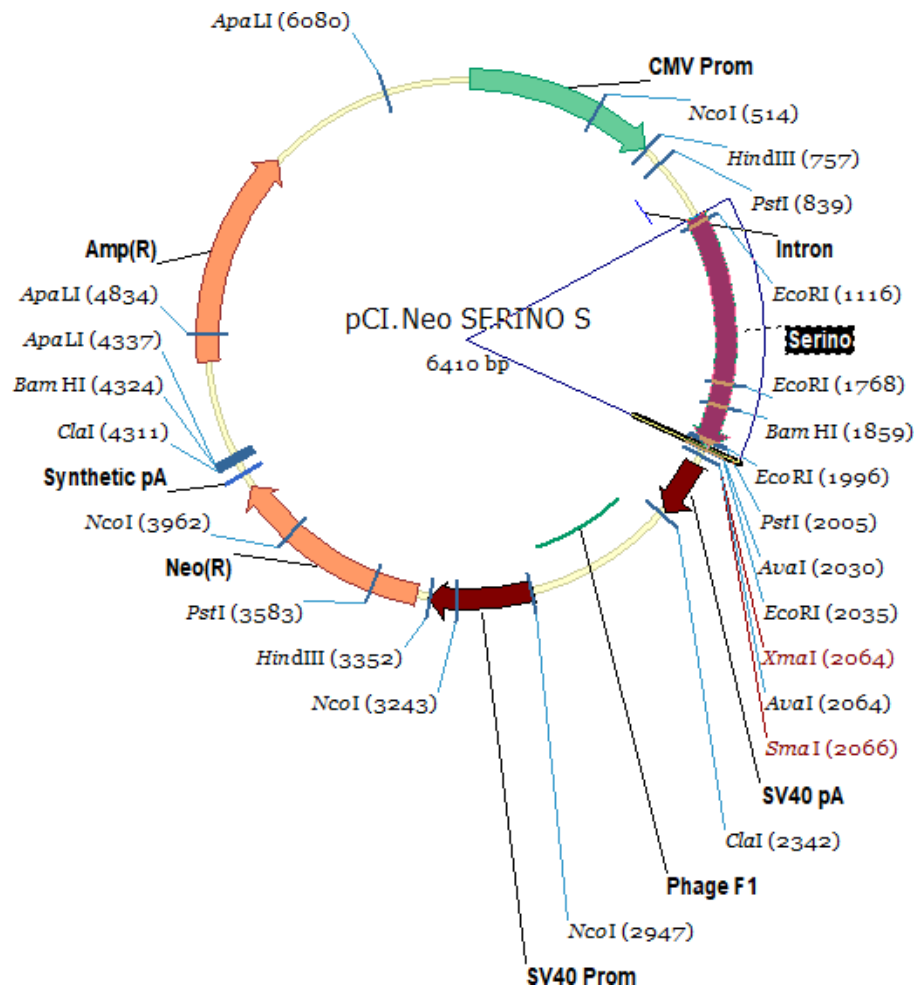
**Figura 3:** Eletroforese em gel de agarose 1%. 1: Ladder 1Kb plus (Thermo Scientific). Em destaque os plasmídeos recombinantes pCR\_Blunt\_Serino (clones 14 e 17) digeridos com a enzima de restrição BamHI. Poços vazios do gel são observados (2 a 10) e clones não escolhidos para dar seguimento ao estudo (11, 12, 13, 15 e 16).

Os plasmídeos 14 e 17 destacados na figura 3 foram submetidos a uma reação de sequenciamento de Sanger com EDTA/Acetato de sódio e ETOH. Após a análise dos mesmos, o plasmídeo 17 foi selecionado (figura 4) e posteriormente submetido à digestão com as enzimas de restrição *XhoI* e *HindIII*. O produto da digestão foi cortado do gel, purificado e clonado no vetor de expressão pCI-neo com a enzima Klenow a 37°C, por 1 hora. A construção do vetor de expressão pCI-neo\_Serino foi esquematizada na figura 5.



**Figura 4:** Eletroforese em gel de agarose 1%. **1-** Ladder 1Kb plus (Thermo Scientific). **2-** Em destaque o plasmídeo recombinante de interesse clonado em pCR\_Blunt\_Serino digerido com a enzima de restrição BamHI.



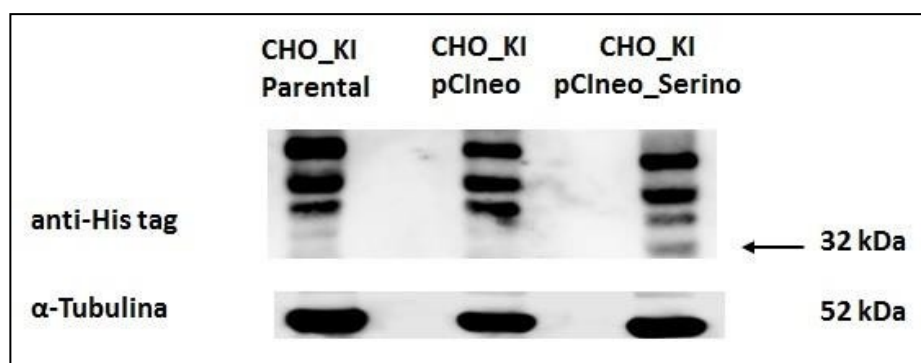


**Figura 5:** Mapa circular do vetor de expressão pCI-neo contendo o gene da serinoprotease de *C. d. collilineatus*. Retirado do programa de edição de plasmídeos – invitrogen. Fonte: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/pci-neo-mammalian-expression-vector-protocol.pdf>.

## 5.2 – Transfecção transiente do plasmídeo pCI-neo\_Serino e imunodeteção da expressão da proteína recombinante de *C. d. collilineatus*

As células transfectadas, advindas da transfecção transiente do plasmídeo pCI-neo\_Serino na linhagem celular CHO-K1, foram recuperadas após 48 horas para a extração de proteínas e avaliação das mesmas por Western Blot. Com o intuito de confirmar a expressão da proteína recombinante de *C. d. collilineatus*, foi utilizado o

anticorpo monoclonal Anti-His-Tag. Pode-se observar que apenas a amostra (CHO- K1 pCI.neo\_Serino) reagiu com o anticorpo monoclonal, indicando que houve o reconhecimento da cauda de histidina presente na proteína de interesse de 32kDa. Para as amostras controles (CHO- K1 parental e CHO- K1 pCI.neo), não houve imunodeteção pelo anticorpo Anti- His Tag ( Figura 6)



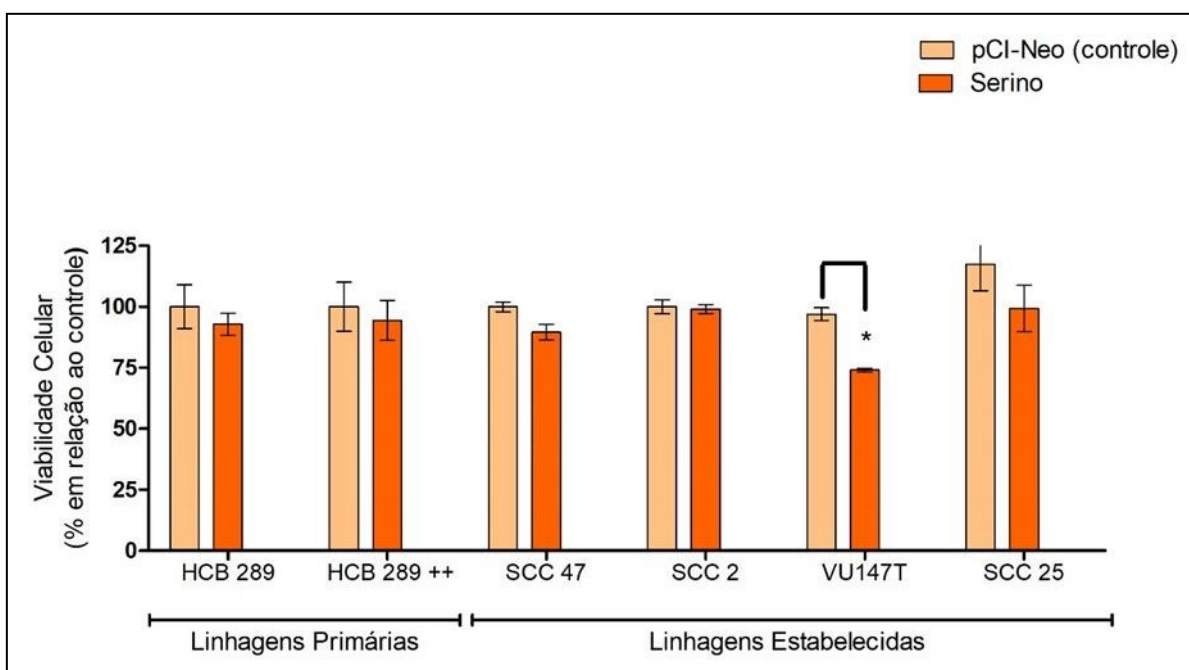
**Figura 6:** Detecção da serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus* por western blot. Para a confirmação da expressão da proteína de interesse (Serinoprotease), a linhagem celular CHO-K1 não editada (CHO\_K1 parental) assim como a linhagem celular CHO\_k1 contendo somente o vetor de expressão foram submetidas a extração proteica. A presença da marcação da  $\alpha$ -tubulina representa o controle do processo como um todo.

### 5.3 – Ensaio de viabilidade celular das linhagens tumorais de cabeça e pescoço tratadas com serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus*

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados utilizando o sobrenadante contendo a serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus* produzida mediante a transfecção transiente do plasmídeo pCI.neo\_Serino com lipofectamine3000 na linhagem celular CHO-K1. Após 48 horas da transfecção, o sobrenadante da cultura celular foi coletado, filtrado e utilizado para tratar 6 linhagens tumorais derivadas de cabeça e pescoço: HCB289 (primária), HCB289++ (expressam os marcadores tronco

tumorais CD44 e ALDH1), SCC47, SCC2, VU147T, SCC25. O ensaio de MTS foi realizado após 72 horas de tratamento.

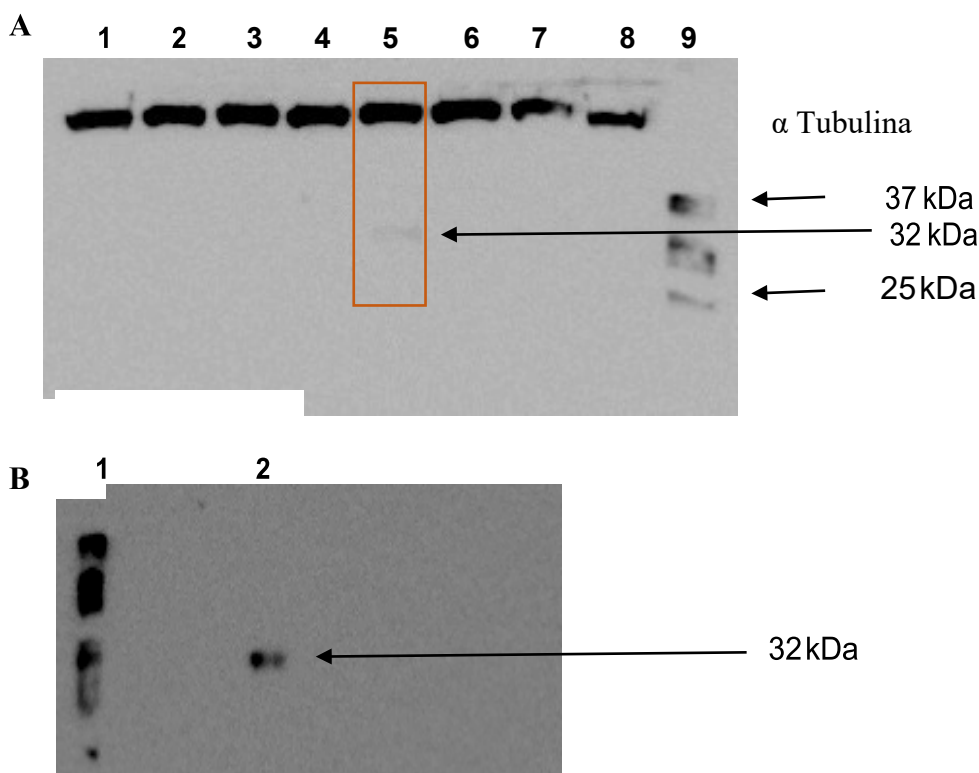
A figura 7 apresenta os resultados dos testes com células tumorais no qual a serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus* apresentou baixa citotoxicidade sobre as seguintes linhagens tumorais: HCB289 (7%), HCB289<sup>++</sup> (5%), SCC47 (8%), SCC2 (1%) e SCC25 (17%). A maior citotoxicidade da serinoprotease recombinante *C. d. collilineatus* foi observada sobre a linhagem VU147T (Figura 7), com 30% de citotoxicidade celular.



**Figura 7:** Análise da viabilidade celular da serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus* por transfecção transiente em HCB289, HCB289<sup>++</sup>, SCC47, SCC2, VU147T, SCC25 a partir do ensaio de MTS. As culturas de células foram tratadas com o sobrenadante contendo a Serinoprotease por 48 horas. Após 48 horas de tratamento, as células foram expostas ao composto MTS cuja sua diluição foi em DMEM 10%SFB.

#### 5.4 – Clones obtidos a partir do single cell sorting

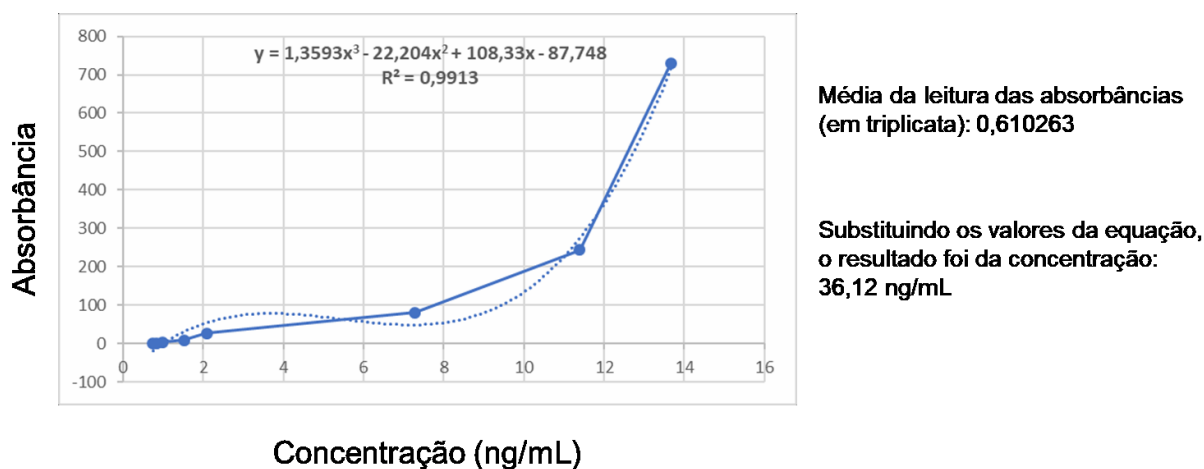
Após os ensaios de individualização de clones por *Single Cell Sorting*, os mesmos foram submetidos a extração de proteínas e posteriormente análise por Western Blot com o intuito de avaliar a expressão proteica dos clones escolhidos. A figura 8 mostra que dos oito clones avaliados, apenas o Clone 5 Serino (*serinoprotease recombinante de C. d. collilineatus*) apresentou marcação da proteína de interesse em torno de 32kDa, confirmando a eficiência do experimento.



**Figura 8:** Análise da expressão de proteínas. Western blot feito à partir de uma seleção de clones por single cell sorting do plasmídeo pCIneo\_Serino com Lipofectamine3000 (Thermo Scientific) na linhagem celular CHO-K1. (Thermo Scientific). **A:** Screening dos clones (1 a 8) obtidos após a individualização das células que expressam constitutivamente o pCI-Neo\_Serinoprotease. **9-** Padrão de massa molecular. O Clone de numero 5 foi o indicado para a continuação do estudo pois continha a maior expressão da proteína de interesse. **B:** Confirmação da expressão proteica. **1-** CHO-K1\_pCI-Neo. **2-** pCI-Neo\_Serino 5 (clone 5), cuja massa apresenta 32 kDa.

### 5.5 – Quantificação do Clone 5 por Elisa

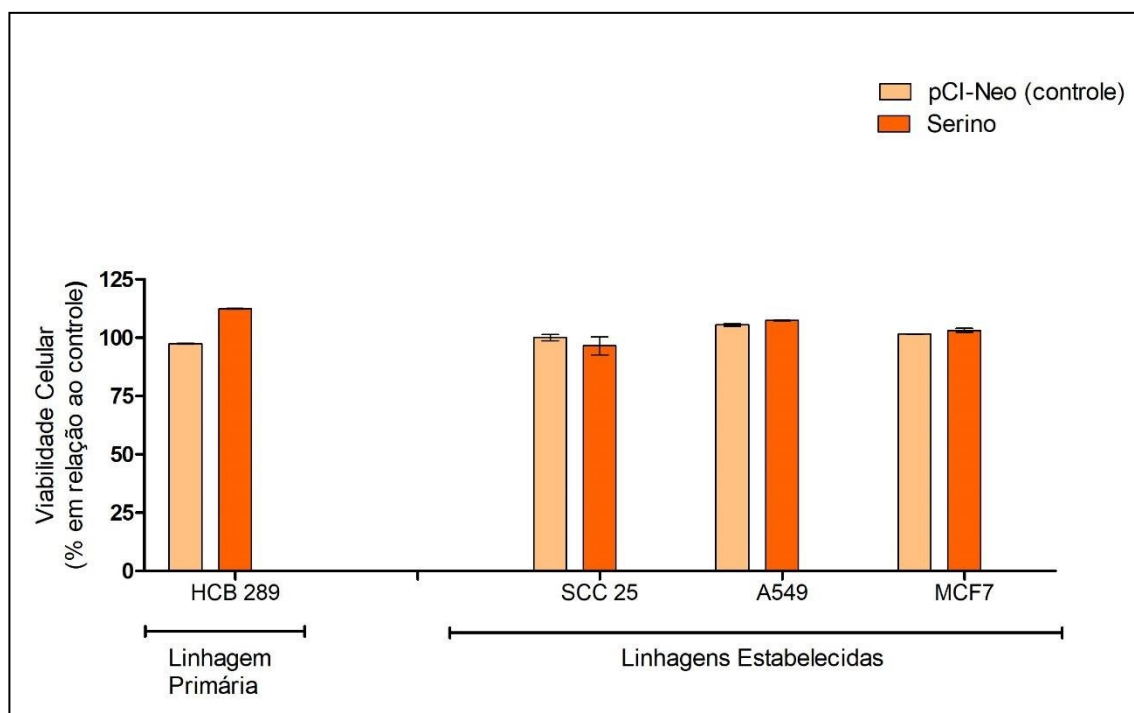
O resultado foi dado a partir da substituição do valor da leitura das amostras pelo “x” da equação gerada após a leitura da absorbância (em ng/mL) pré-estabelecidos pelo kit *His Tag ELISA Detection (Genscript)*. O valor da concentração obtida foi de 36,12 ng/mL da serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus*. (Figura 9).



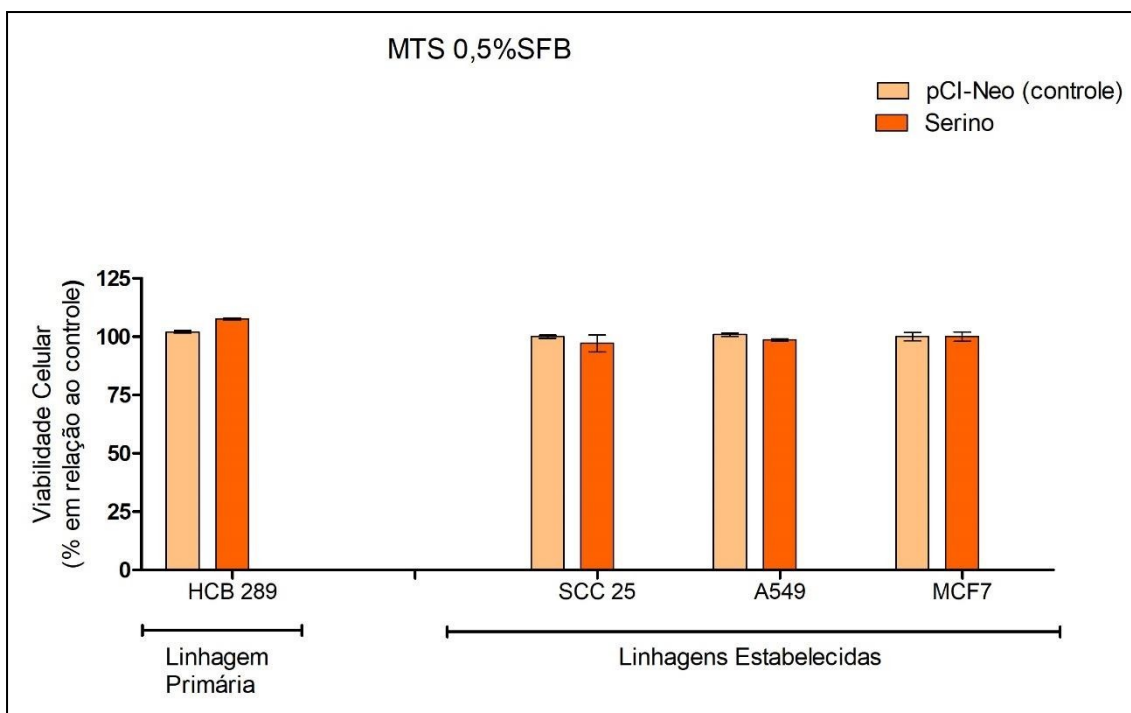
**Figura 9:** Gráfico da imunoquantificação da serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus*

### 5.6 – Ensaios de viabilidade celular (MTS) de linhagens tumorais tratadas com a serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus*

As figuras 10 e 11 apresentam os resultados dos ensaios de viabilidade celular com a concentração estimada de 36 ng/mL serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus* frente às diversas linhagens tumorais contendo diferentes concentrações de soro fetal bovino (SFB). Pode-se observar que a serinoprotease recombinante avaliada em 10% e 0,5% de SFB não apresentou alteração na viabilidade das linhagens tumorais testadas comparadas ao controle. Uma vez que foi observada uma tendência no aumento da viabilidade na linhagem HCB 289, o ensaio foi repetido sob as mesmas condições com outra concentração de SFB (1%). A hipótese era que o soro estava influenciando de alguma forma

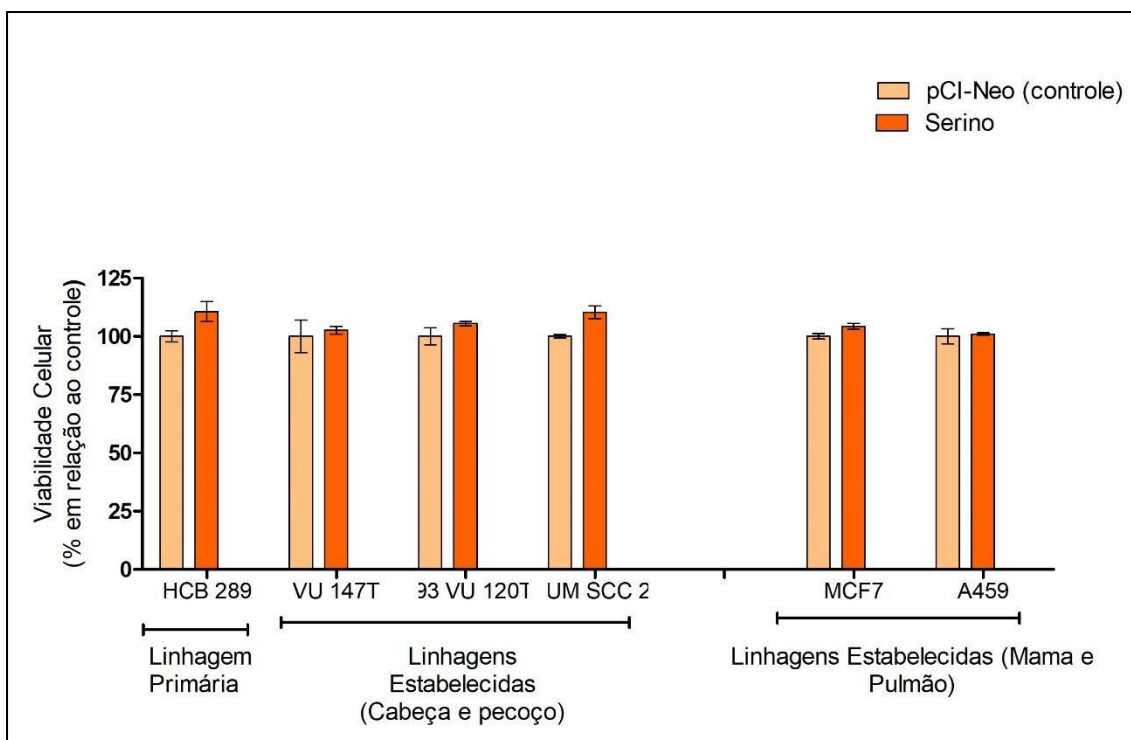


**Figura 10:** Análise da viabilidade celular em HCB289, SCC25, A549 e MCF7 a partir do ensaio de MTS 48 horas após o tratamento com aproximadamente 36 ng/mL da serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus* contendo 10% de SFB. Não houve significância estatística.

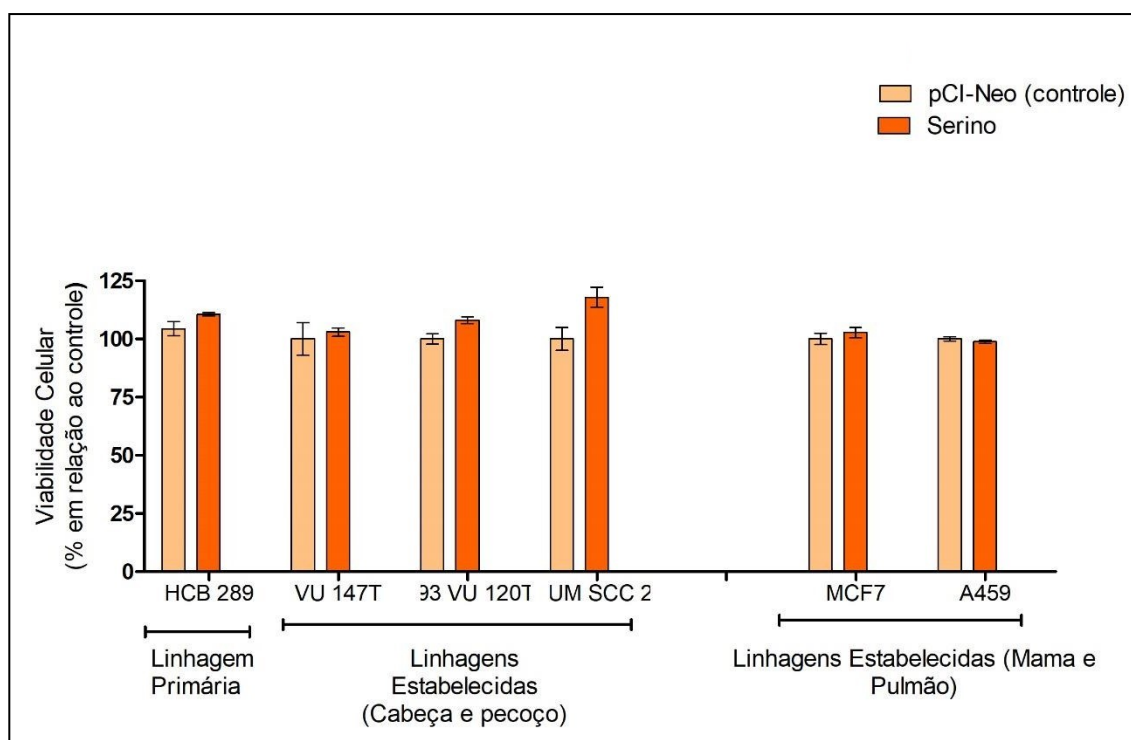


**Figura 11:** Análise da viabilidade celular em HCB289, SCC25, A549 e MCF7 a partir do ensaio de MTS 48 horas após o tratamento com aproximadamente 36 ng/mL da serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus* contendo 0,5% de SFB. Não houve significância estatística.

Apesar da queda do aumento da viabilidade celular na linhagem HCB 289, foi observado um sofrimento celular generalizado provavelmente causado pela falta de SFB. De acordo com os resultados anteriores, uma nova análise da ação da serinoprotease recombinante sobre algumas linhagens tumorais foi realizada a partir do ensaio de MTS após 48 de tratamento contendo 1% de soro fetal bovino. As figuras abaixo mostram que tanto para o tratamento após 48 e 72 horas na concentração de 1% de SFB não houve diminuição na viabilidade das linhagens tumorais testadas comparadas com o controle. Figuras 12 e 13.



**Figura 12:** Análise da viabilidade celular em HCB289, VU147T, VU120T, SCC2, MCF7 e A549 a partir do ensaio de MTS 48 horas de tratamento e 48 horas de leitura com aproximadamente 36 ng/mL da serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus* contendo 1% de SFB. Não houve significância estatística.



**Figura 13:** Análise da viabilidade celular em HCB289, VU147T, VU120T, SCC2, MCF7 e A549 a partir do ensaio de MTS 48 horas de tratamento e 72 horas de leitura com aproximadamente 36 ng/mL da serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus* contendo 1% de SFB. Não houve significância estatística.



## 5.7 – Ensaios de apoptose

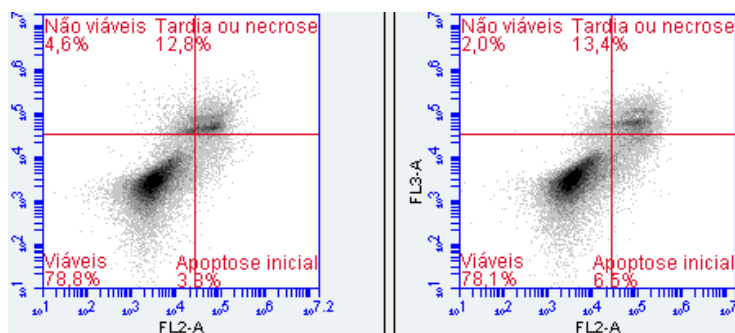
Os resultados do ensaio de apoptose apresentados na tabela 4 e na figura 14 mostram que a serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus* não revelou ação apoptótica frente às linhagens tumorais avaliadas (HCB289 e VU120T).

**Tabela 4:** Valores em porcentagem obtidos a partir do ensaio de apoptose nas linhagens HCB289 e VU120T tratadas com a serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus*.

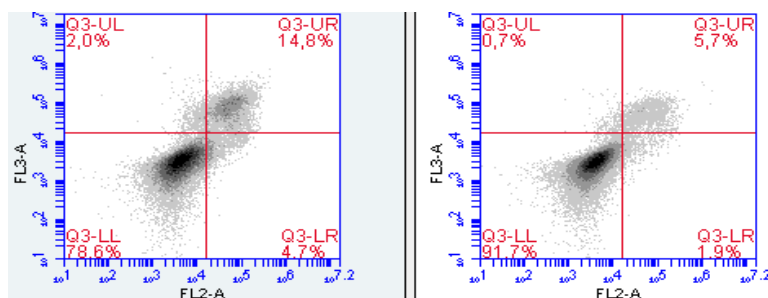
	Células		Viáveis	Apoptose inicial	Tardia ou necrose	Não viáveis
	Eventos	% Total	% Viáveis	% Apoptose inicial	% Tardia ou necrose	% Células não viáveis
HCB289_pCneo_DUPLA MARCAÇÃO	32.566	100,00%	78,56%	4,72%	14,75%	1,97%
HCB289_Serino5_DUPLA MARCAÇÃO	30.487	100,00%	91,67%	1,95%	5,67%	0,72%

	Células		Viáveis	Apoptose inicial	Tardia ou necrose	Não viáveis
	Eventos	% Total	% Viáveis	% Apoptose inicial	% Tardia ou necrose	% Células não viáveis
VU120T_pCneo_DUPLA MARCAÇÃO	30.728	100,00%	78,82%	3,78%	12,78%	4,62%
VU120T_Serino5_DUPLA MARCAÇÃO	30.933	100,00%	78,07%	6,53%	13,43%	1,97%

### Resultado apoptose VU120T



### Resultado apoptose HCB289



**Figura 14:** Análise apoptótica em linhagens primárias de tumores de cabeça e pescoço (HCB289 e VU120T) tratadas com 36 ng/mL da serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus*. Observa-se uma tendência proliferativa na linhagem HCB 289 apesar de não haver significância estatística.

## 6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Diversas moléculas compõem a peçonha de serpentes da família Viperidae como metaloproteases, fosfolipases A<sub>2</sub>, L-aminoácido oxidases, hialuronidases, serinoproteases e outras substâncias (Calvete; Juárez; Sanz, 2007; Ramos; Selistre-de- Araujo, 2006). Apesar das toxinas isoladas de peçonhas de serpentes apresentarem efeitos toxicológicos, muitas são utilizadas para fins farmacológicos (Vyas et al., 2013) devido à ação antimicrobiana, antiviral, antiparasitária, antifúngico e antitumoral (Passero et al., 2007; Muller et al., 2012; Hubbard et al., 2012; Castillo et al., 2012; Yamane et al., 2013; Samy et al., 2012; Koh et al., 2012; Wen et al., 2013; Azevedo et al., 2016).

Para esclarecer o mecanismo de ação dessas toxinas, pesquisadores purificam as peçonhas ofídicas, obtendo baixo rendimento e, além disso, submetendo o animal a uma situação de estresse. Dessa forma, a utilização de métodos de obtenção dessas toxinas através de um sistema heterólogo de expressão, viabiliza a obtenção das mesmas em quantidades adequadas para o estudo aprofundado de suas propriedades e utilização terapêutica, além de diminuir a necessidade da manipulação do animal (Maeda et al., 1991; Yu et al., 2007).

Para a expressão de glicoproteínas, como as serinoproteases de peçonhas de serpentes (SVSPs), são usados como sistemas de expressão, bactérias (Fan, 1999; Jiang; Xu; Yang, 2010; Lin et al., 2009; Maeda et al., 1991; Yang et al., 2009; Zha et al., 2003) leveduras (Muanpasitporn; Rojnuckarin, 2007; Yang et al., 2009; You et al., 2004) e células de mamíferos (Yonamine et al., 2009), mas para a obtenção das SVSPs ativas, é necessário um sistema de expressão eucariótico que disponha de mecanismos de glicosilação e formação de pontes dissulfeto (Horvat; Zoldoš; Lauc, 2011).

Após a eficiência em todas as etapas metodológicas de clonagem e expressão, foi possível a obtenção da serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus* que apresentou massa molecular de 32 kDa detectada em ensaio de Western Blot utilizando o anticorpo primário Anti-His Tag, que interage com a cauda de histidina da proteína de interesse. Sabe-se que as SVSPs apresentam massas moleculares variando entre 23 e 67 kDa, e estas diferenças podem estar relacionadas com as taxas de glicosilação que variam de uma enzima para outro (Serrano & Maroun, 2005).

Comparando os resultados deste trabalho com os resultados obtidos por Boldrini-França et al., 2015, pudemos observar que a serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus* produzida em *P. pastoris* (rCollineina-1, 28,868 Da) como em células de mamífero (pCI-Neo\_Serino, 32,000 Da) apesar de serem a mesma toxina apresentaram massas moleculares distintas e este fato pode estar relacionado com o sistema de expressão escolhido, o método de análise das massas moleculares bem como os padrões de glicosilação que estas proteases apresentam na sua estrutura. O trabalho de Maccani compara a expressão de de proteínas recombinantes tanto em leveduras quanto em células de mamíferos e o que foi observado é que o sistema de clonagem quando é feito a partir de células CHO (células de ovário de hamster chinês) existe uma maior concentração do produto. O mesmo acontece quando se compara a temperatura de manuseio das células CHO é de 37° C, o que facilitaria futuras clonagens pois a maioria das enzimas de restrição tem sua atividade ótima a 37° C. (Maccani, et al, 2014).

Atualmente, a literatura relata uma gama de toxinas isoladas de peçonha de serpentes que apresentam ação sobre células tumorais. Os mecanismos variam entre inibição da agregação plaquetária, da proliferação e da adesão celular, indução da apoptose, diminuição do volume tumoral e alteração da viabilidade de células tumorais (Chiang; Yang; Huang, 1996; Debnath et al., 2010; Teixeira *et al.*, 2016; Han et al., 2014).

A citotoxicidade da serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus* foi avaliada sobre as seguintes células tumorais (HCB289, HCB289++, SCC47, SCC2, VU147T, SCC25, MCF7 e A549). Após análise dos dados, a proteína recombinante de *C. d. collilineatus* foi capaz de causar citotoxicidade apenas às células tumorais de cabeça e pescoço VU147T.

Estudos realizados por Oliveira, 2017 demonstraram que a serinoprotease recombinante de *B. pauloensis* (rBpSP-I) apresentou citotoxicidade significativa frente às células tumorais MCF7, HL-60 e HepG2. Todavia, a proteína mostrou baixa ou nula citotoxicidade às células não tumorais Hek293 e PBMC. Dessa forma, no presente estudo, a concentração da proteína recombinante usada foi inferior a todas as concentrações usadas no estudo de Oliveira, indicando que para os futuros ensaios, a concentração usada deverá ser revista.

Algumas linhagens tumorais foram submetidas à diferentes concentrações de soro fetal bovino e diferentes tratamentos com a serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus* para avaliação da citotoxicidade. Apesar de terem sido realizados os ensaios nas diversas condições, a serinoprotease não apresentou resultado significativo de diminuição da viabilidade celular em nenhuma linhagem tumoral avaliada.

Apesar das diversas funções das serinoproteases de peçonhas de serpentes (Alves da Silva, 2011), poucos estudos são encontrados na literatura que relatam a ação destas proteases sobre células tumorais. Dessa forma, os estudos apresentados neste trabalho revelaram a eficiência na produção da serinoprotease recombinante de *C. d. collilineatus*, porém são necessários mais ensaios para compreender o mecanismo de ação destas proteases frente às células tumorais.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES DA SILVA, J.A. et al. Gyroxin increases blood-brain barrier permeability to Evans blue dye in mice. **Toxicon** 57 (2011) 162-167. doi:10.1016/j.toxicon.2010.06.027.

ARGIRIS, A. et al. Head and neck cancer. **Lancet**, v. 371, n. 9625, p. 1695-709, May 17 2008. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18486742> >.

AZEVEDO, F. V. P. V. et al. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA<sub>2</sub> homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **International journal of biological macromolecules**, v. 82, p. 671-7, 5 jan. 2016.

BOLDRINI-FRANCA, J. et al. Crotalus durissus collilineatus venom gland transcriptome: analysis of gene expression profile. **Biochimie**, v. 91, n. 5, p. 586-95, May 2009. ISSN 1638-6183 (Electronic) 0300-9084 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19230843> >.

BOLDRINI-FRANCA, J. et al. Expression of a new serine protease from Crotalus durissus collilineatus venom in Pichia pastoris and functional comparison with the native enzyme. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, n. 23, p. 9971-86, Dec 2015. ISSN 1432-0614 (Electronic) 0175-7598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26227411> >.

BOLDRINI-FRANCA, J. et al. Snake venomomics and antivenomics of Crotalus durissus subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **J Proteomics**, v. 73, n. 9, p. 1758-76, Aug 5 2010. ISSN 1876-7737 (Electronic) 1874-3919 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542151> >.

Braud, S.; Bon, C.; Wisner, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie** v. 82, p. 851–859, 2000.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: **GLOBOCAN** estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018.

BRAY, F. et al. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **Int J Cancer**, v. 132, n. 5, p. 1133-45, Mar 1 2013. ISSN 1097- 0215 (Electronic) 0020-7136 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22752881> >.

BRENO, M. C.; PICARELLI, Z. P. The vasopressor action of angiotensin in the snake *Bothrops jararaca*. **Comp Biochem Physiol Comp Physiol**, v. 101, n. 4, p. 819-25, Apr 1992. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1351456> >.

CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **Journal of mass spectrometry : JMS**, v. 42, n. 11, p. 1405-14. 2007.

CAMPANA, I. G. **Tumores de cabeça e pescoço: epidemiologia, fatores de risco, diagnóstico e tratamento** *Revista Odontológica de Araçatuba*. araçatuba. 34: 20-26 p. 2013.

CASTILLO, J. et al. In Vitro Antiplasmodial Activity of Phospholipases A2 and a Phospholipase Homologue Isolated from the Venom of the Snake *Bothrops asper*. **Toxins**, p. 1500-1516, 2012.

Castro, H. C., Zingali, R. B., Albuquerque, M. G., Pujol-Luz, M., Rodrigues, C. R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 61, p.843-856, 2004.

CHIANG; YANG; HUANG. Thrombin enhances the adhesion and migration of human colon adenocarcinoma cells via increased beta 3-integrin expression on the tumour cell surface and their inhibition by the snake venom peptide, rhodostomin. **British journal of cancer**, p. 902-8, 1996.

CORY, A. H., OWEN, T. C., BARLTROP, J. A., CORY, J.G., Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Commun**, 1991 **3**(7): 207-212.

Damm, M., Hempel, B.F., Nalbantsoy, A., Sussmuth, R.D., Comprehensive Snake Venomomics of the Okinawa Habu Pit Viper, *Protobothrops flavoviridis*, by Complementary Mass Spectrometry-Guided Approaches. **Molecules** 2018, 23, 1893; doi:10.3390/molecules23081893.

DEBNATH, A. et al. A lethal cardiotoxic-cytotoxic protein from the Indian monocellate cobra (*Naja kaouthia*) venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 56, n. 4, p. 569-79. 2010.

Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Coordenação de Prevenção e Vigilância**. – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Coordenação de Prevenção e Vigilância**. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

FAN, Q. Expression of human b-subunit nerve growth factor (hNFB) in yeast *Pichia pastoris* and *E. coli*. v. 44, n. 6, 1999.

FERNANDES, C. A. H. **Estudos estruturais e filogenéticos com fosfolipases e serino proteases de venenos de serpentes botrópicas nativas e quimicamente modificadas. 2009. Dissertação (Mestrado)** Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, Botucatu.

FRANÇA, J. B. **Expressão e caracterização de uma protease de interesse biotecnológico clonada da glândula de peçonha de crotalus durissus collilineatus. 2013. Tese (Doutorado)** Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

GRIGG, C. et al. Talimogene laherparepvec (T-Vec) for the treatment of melanoma and other cancers. **Semin Oncol**, v. 43, n. 6, p. 638-646, Dec 2016. ISSN 1532-8708 (Electronic) 0093-7754 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28061981> >.

GUERRA-DUARTE, C. et al. Partial in vitro analysis of toxic and antigenic activities of eleven Peruvian pitviper snake venoms. **Toxicon** (2015), doi: 10.1016/j.toxicon.2015.09.007.

HAN, R. et al. Crotoxin induces apoptosis and autophagy in human lung carcinoma cells in vitro via activation of the p38 MAPK signaling pathway. **Acta Pharmacologica Sinica** (2014) 35: 1323–1332; doi: 10.1038/aps.2014.62.

HORVAT, T.; ZOLDOŠ, V.; LAUC, G. Evolutional and clinical implications of the epigenetic regulation of protein glycosylation. **Clinical epigenetics**, v. 2, n. 2, p. 425- 32. 2011.



HUBBARD, S. et al. Contortrostatin, a homodimeric disintegrin isolated from snake venom inhibits herpes simplex virus entry and cell fusion. **Antiviral therapy**, p. 1319-26, 2012.

HUMBERTO A. S. et al. Estudos estruturais da formação oligomérica da crotoxina e seus complexos. *Revista Brasileira de Física Médica*, v. 7, n. 2, p. 113-6, 2013.

Inca. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <  
<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo10/consultar.xhtml> >.  
Acesso em: 2016 11 24.

JIANG, X.; XU, J.; YANG, Q. Soluble expression, purification, and characterization of Gloydus shedaoensis venom glosedobin in *Escherichia coli* by using fusion partners. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 635-642, 2010.

KANG, H. et al. Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 12, n. 1, p. 11-26, Jan 2015. ISSN 1759-4782 (Electronic) 1759-4774 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25403939> >.

KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics--cardiovascular examples. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 59, n. 4, p. 497-506. 2012.

LIU, C. C. et al. Biotoxins for cancer therapy. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 12, p. 4753-8, 2014. ISSN 1513-7368 (Print) 1513-7368 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24998537> >.

MAEDA, M. et al. Expression of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **Journal of biochemistry**, v. 109, n. 4, p. 632-7. 1991.

Ministério da saúde. **Situação Epidemiológica- Dados**, 2017. Disponível em:  
<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos/13712-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em: 2018 11 24.

MORJEN, M. et al. PIVL, a new serine protease inhibitor from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, impairs motility of human glioblastoma cells. **Matrix Biology** 32 (2013) 52-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2012.11.015>.

MUANPASITPORN, C.; ROJNUCKARIN, P. Expression and characterization of a recombinant fibrinogenolytic serine protease from green pit viper (*Trimeresurus albolabris*) venom. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 49, n. 8, p. 1083-9. 2007.

MUKHERJEE, A. K. et al. Apoptosis induction in human breast cancer (MCF-7) cells by a novel venom L-amino acid oxidase (Rusvinoxidase) is independent of its enzymatic activity and is accompanied by caspase-7 activation and reactive oxygen species production. **Apoptosis**, v. 20, n. 10, p. 1358-72, Oct 2015. ISSN 1573-675X (Electronic) 1360-8185 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26319994> >.

MULLER, V. et al. Crotoxin and phospholipases A2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. **Toxicon**, p. 507-515, 2012.

OLIVEIRA-SILVA, R. J. et al. Anti-EGFR Therapy: Strategies in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Recent Pat Anticancer Drug Discov**, v. 11, n. 2, p. 170- 83, 2016. ISSN 2212-3970 (Electronic) 1574-8928 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26955963> >.

PASSERO, L. F. et al. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus ssp.* venoms. **Parasitology research**, v. 101, n. 5, p. 1365-71. 2007.

PEREIRA, A. **Toxicidade seletiva da crotamina do veneno de crotalus durissus terrificus sobre as células indutoras de tumores 2011. Tese (doutorado)** Universidade de sao paulo, São paulo.

RAMOS, O. H.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Snake venom metalloproteases--structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 142, n. 3-4, p. 328-46. 2006.

Rawlings, N. D.; Barret, A. J. Serine peptidases and their clans, In **Handbook of proteolytic enzymes**. N. D. Rawlings, A. J. Barret, and J. f. Woessner. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press Ltd. 2004.

REBELLO HORTA, C. C. et al. Cardiovascular-Active Venom Toxins: An Overview. **Curr Med Chem**, v. 23, n. 6, p. 603-22, 2016. ISSN 1875-533X (Electronic) 0929- 8673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26812904> >.

Répteis brasileiros: **Lista de espécies**. 2014. Disponível em: < <http://www.sbherpetologia.org.br/images/LISTAS/2014.03-07-MudancasTaxonomicas.pdf> >. Acesso em: 2016 11 25.

RODRIGUES, C.R. et al. Proteomic profile, biological activities and antigenic analysis of the venom from *Bothriopsis bilineata smaragdina* (“loromachaco”), a pitviper snake from Peru. **Journal of Proteomics** (2018), <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.07.016>.

SAMY, R. P. et al. Snake venom phospholipases A(2): a novel tool against bacterial diseases. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 36, p. 6150. 2012.

Serrano, S. M. T., Maroun, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**. v. 45, p.1115-1132, 2005.

TAKACS, Z. et al. Animal Venoms in Medicine. In: WEXLER, P. (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology**. Third. London: Elsevier, 2014. p.252-259. ISBN 978-0-12-386455-0.

TEIXEIRA, T. L. et al. Isolation, characterization and screening of the in vitro cytotoxic activity of a novel L-amino acid oxidase (LAAOcdt) from *Crotalus durissus terrificus* venom on human cancer cell lines. **Toxicon**, v. 119, p. 203-17, Sep 1 2016. ISSN 1879-3150 (Electronic) 0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27317870> >.

**The Reptile Database**. 2018. Disponível em: < [http://reptile-database.reptarium.cz/advanced\\_search?taxon=Viperidae&submit=Search](http://reptile-database.reptarium.cz/advanced_search?taxon=Viperidae&submit=Search) >. Acesso em: 2018 11 25.

TORRE, L. A. et al. **Global cancer statistics, 2012**. *CA Cancer J Clin*, v. 65, n. 2, p. 87-108, Mar 2015. ISSN 1542-4863 (Electronic) 0007-9235 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25651787> >.

VYAS, V. et al. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 2, p. 156-162, 2013.

WEI, L. et al. Identification and Characterization of the First Cathelicidin from Sea Snakes with Potent Antimicrobial and Anti-inflammatory Activity and Special Mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, p. 16633-16652, 2015.

WHO. **Cancer fact sheet n° 297**. 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> >.

WHO. **Snakebite envenoming**. 2018 Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming> Acesso em: 2018 11 25.

YAMANE, E. et al. Unraveling the antifungal activity of a South American rattlesnake toxin crotamine. **Biochimie**, p. 231-240, 2013.

YAN, C., et al. Autophagy is involved in cytotoxic effects of crotoxin in human breast cancer cell line MCF-7 cells. **Acta Pharmacol Sin** (2007) Apr; 28 (4): 540–548; doi: 10.1111/j.1745-7254.2007.00530.

YANG, D. et al. Expression, purification and characterization of Gloydius shedaoensis venom glosedobin as Hsp70 fusion protein in *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**, v. 66, n. 2, p. 138-42. 2009.

YONAMINE, C. M. et al. Cloning of serine protease cDNAs from *Crotalus durissus terrificus* venom gland and expression of a functional Gyroxin homologue in COS-7 cells. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 54, n2, p. 110-20. 2009.

YOU, W.-K. et al. Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin- like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. **FEBS Letters**, p. 67- 73, 2004.

YU, X. et al. Expression and purification of ancrod, an anticoagulant drug, in *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**, v. 55, n. 2, p. 257-61. 2007.

ZHA, X. D. et al. cDNA cloning and high-level expression of a thrombin-like enzyme from Agkistrodon acutus venom. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, v. 25, n. 4, p. 253-7. 2003.