

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Expressão de uma serinoprotease de *Bothrops pauloensis* em *Pichia pastoris* e avaliação da sua atividade citotóxica sobre diferentes linhagens tumorais.

Anna Cecília Vieira Carneiro

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Dezembro - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Expressão de uma serinoprotease de *Bothrops pauloensis* em *Pichia pastoris* e avaliação da sua atividade citotóxica sobre diferentes linhagens tumorais.

Anna Cecília Vieira Carneiro

Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues

Profa. Dra. Daiana Silva Lopes

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Dezembro - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Expressão de uma serinoprotease de *Bothrops pauloensis* em *Pichia pastoris* e avaliação da sua atividade citotóxica sobre diferentes linhagens tumorais.

Anna Cecília Vieira Carneiro

Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues

Instituto de Biotecnologia - UFU

Profa. Dra. Daiana Silva Lopes

Instituto Multidisciplinar em Saúde -
UFBA

Homologado pela coordenação do Curso de

Biotecnologia em __/__/____

Prof. Dr. Edgar Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG

Dezembro - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Expressão de uma serinoprotease de *Bothrops pauloensis* em *Pichia pastoris* e avaliação da sua atividade citotóxica sobre diferentes linhagens tumorais.

Anna Cecília Vieira Carneiro

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues

Uberlândia, 14 de dezembro de 2018

Dedico este trabalho à toda minha família que sempre me ensinou o valor dos estudos e que desde o início apoiou minhas escolhas, permaneceu ao meu lado e nunca me deixou desamparada nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me sustentado nos momentos de indecisão e me dado forças para concluir mais esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Cristiano e Denise, por sempre estarem comigo, me ensinando o valor dos estudos, me dando amor, carinho e colo quando precisei. Amo vocês! Obrigada por tudo que fazem por mim!

À minha irmã Letícia por todo apoio que você sempre me deu.

À minha vó Zena que sempre me anima e torce para o meu sucesso.

À minha orientadora Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues, por toda atenção, apoio, auxílio, cuidado, parceria, e por sempre me incentivar a melhorar. Obrigada pelas oportunidades que você me proporcionou. Com certeza, seus conselhos me fizeram crescer pessoalmente e profissionalmente. Muito obrigada por tudo!

À minha co-orientadora Profa. Dra. Daiana da Silva Lopes por sempre estar disposta a me ajudar e ensinar.

Às Professoras Dras. Veridiana Melo Rodrigues, Cássia Regina da Silva e Kelly A. G. Yoneyama por terem aberto as portas do laboratório para mim, e por todo aprendizado.

Aos meus colegas de laboratório, pela amizade, pelo companheirismo, por toda a ajuda nos experimentos, pelos aprendizados e conselhos, por todas as conversas engraçadas, e pela melhora da minha vida financeira.

Às técnicas Marina e Sebastiana (Tianinha) por toda a ajuda no laboratório e nos experimentos. Não sei o que faria no laboratório sem vocês.

À Luana, minha parceira e irmã de laboratório, como muitos dizem. Obrigada pelos conselhos, pelas risadas, colaboração e parceria imensa que você dá. Até que a nossa comunicação está melhorando agora.

Aos meus colegas da 13ª turma de Biotecnologia, que sempre tornaram meus dias mais felizes e divertidos. Não podia deixar de agradecer principalmente ao “grupo dos trabalhos” (que de trabalho tinha nada). Sempre estiveram comigo nos melhores e piores momentos. Amo vocês!

Aos professores do curso de Biotecnologia, que com certeza me deram bons exemplos de profissionalismo e dedicação.

À Dra. Tássia Rafaella Costa pelo acolhimento em seu laboratório, por todo aprendizado, pela paciência e disposição em esclarecer minhas dúvidas.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Instituto de Biotecnologia por contribuírem na minha formação.

Ao CNPq pela concessão das bolsas de iniciação científica que me permitiram entrar no meio científico.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho!

RESUMO

O Brasil apresenta um grande potencial biotecnológico, uma vez que há uma grande diversidade da fauna e da flora. A exploração benéfica, segura e consciente desses recursos leva a descoberta de moléculas e modelos que podem ser usados para fins terapêuticos. Muitos estudos revelam o potencial biotecnológico de toxinas isoladas de peçonhas de serpentes, portanto elas são estudadas tanto para entender questões relacionadas ao envenenamento, quanto para atuar como modelos terapêuticos. As serinoproteases derivadas de peçonhas de serpentes (SVSPs) são proteases glicosiladas conhecidas por possuírem a capacidade de interferir na hemostasia, porém sua atividade antitumoral ainda é pouco explorada. A partir disso, o objetivo desse trabalho é expressar uma serinoprotease recombinante clonada da peçonha de *Bothrops pauloensis* (rBpSP-II) e avaliar sua atividade citotóxica em diferentes linhagens tumorais. Primeiramente a proteína de interesse foi expressa em *Pichia pastoris* por 96h. O primeiro passo cromatográfico utilizado para a purificação da rBpSP-II foi uma cromatografia de afinidade em resina de níquel Ni-NTA Superflow. Após a verificação de que a proteína recombinante não estava pura, foi feito o segundo passo cromatográfico em sistema de HPLC em fase reversa, porém o rendimento proteico ao final da purificação não foi satisfatório, obtendo somente 0,30mg/L. Em seguida foi feito os ensaios citotóxicos em células tumorais (MCF-7 e HepG2) e em células não tumorais (MCF10A). A rBpSP-II apresentou sua maior atividade citotóxica na linhagem MCF-7, matando aproximadamente 40% das células em uma concentração de 50µg/mL, enquanto que na linhagem HepG2 a proteína recombinante foi citotóxica para 20% das células. Entretanto, a rBpSP-II não apresentou citotoxicidade significativa frente a linhagem não tumoral MCF10A, demonstrando sua preferência por células tumorais. Uma vez confirmado seu potencial citotóxico, foi feito um ensaio de indução de apoptose/necrose. Na concentração de 6,25µg/mL da proteína recombinante, aproximadamente 50% das células MCF-7 estavam em processo apoptótico, demonstrando a rBpSP-II pode causar a morte das células tumorais via necrose/apoptose. Portanto, a proteína recombinante rBpSP-II possui um potencial antitumoral, entretanto, mais estudos precisam ser desenvolvidos para elucidar o mecanismo de ação dessas proteases frente às células tumorais.

Palavras-chave: Serinoprotease, hemostasia, atividade antitumoral.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Serpentes	1
1.2. Composição das peçonhas de serpentes.....	2
1.3. Influência dos componentes da peçonha na hemostasia	4
1.4. Serinoproteases	6
1.5. Potencial terapêutico	8
1.5.1. Câncer.....	11
1.6. Expressão heteróloga	13
1.7. Serinoprotease recombinante de <i>Bothrops pauloensis</i> – II (rBpSP-II).....	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1. Expressão da serinoprotease recombinante da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i> (rBpSP-II). 15	15
3.2. Purificação da serinoprotease recombinante de <i>Bothrops pauloensis</i> em resina de níquel Ni-NTA Superflow.....	16
3.3. Cromatografia de Fase Reversa (C18) em sistema HPLC (HPLC-RV).....	16
3.4. Determinação da concentração proteica	17
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)	17
3.6. Manutenção da linhagem celular aderente (HepG2, MCF-7 e MCF10A).....	17
3.7. Subcultivo da HepG2, MCF-7 e MCF10A	18
3.8. Ensaio de citotoxicidade (MTT).....	18
3.9. Análise de apoptose/necrose por citometria de fluxo	19
4. RESULTADOS	19
4.1. Expressão e Purificação da serinoprotease recombinante da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>	19
4.2. Ensaio de citotoxicidade.....	24
4.3. Apoptose/necrose por citometria de fluxo	26
4.4. Purificação por HPLC-RP.....	Erro! Indicador não definido.
4.5. Dosagem e recuperação proteica.....	Erro! Indicador não definido.
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	33
7. REFERÊNCIAS	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Recuperação proteica dos passos cromatográficos da serinoprotease recombinante (rBpSP-II), a partir de 100 mL de meio de cultura.....	24
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Serpente da espécie <i>Bothrops pauloensis</i> (RODRIGUES, 2010).....	2
Figura 2. Perfil transcriptômico da glândula da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i> (RODRIGUES et al., 2012)....	3
Figura 3. Cascata de coagulação sanguínea, culminando para a formação da trombina (DAVIE, 2003).....	4
Figura 4. (A) Estrutura tridimensional de uma SVSP e (B) Detalhe do sítio ativo das SVSPs mostrando os resíduos da tríade catalítica Ser195, His57 e Asp102	7
Figura 5. Representação do fibrinogênio e comparação do padrão catalítico de trombina e SVTLEs.....	8
Figura 6. Amplo espectro de ações toxicológicas e aplicações terapêuticas de toxinas derivadas das peçonhas de serpentes (CALDERON et al., 2014).....	9
Figura 7. Vetor de expressão pPICZ α A (Invitrogen) utilizado para a clonagem das proteínas de interesse obtidas da biblioteca de cDNA (RODRIGUES et al., 2012).....	14
Figura 8. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% da expressão da rBpSP-II em levedura <i>P. pastoris</i> em meio BMMY pH 6,0.....	20
Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% da purificação da rBpSP-II em resina de níquel Ni-NTA Superflow.....	21
Figura 10 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%, após um processo de diálise e concentração das frações 3B, 4A e 4B, obtidas da purificação da rBpSP-II em resina de níquel Ni-NTA Superflow, utilizando o Centricon.....	22
Figura 11. Fracionamento das frações eluídas pela cromatografia de afinidade (2,5mg) em HPLC-RP.....	23
Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%, após a purificação da rBpSP-II por HPLC-RP.....	23
Figura 13. Análise de citotoxicidade da rBpSP-II em HepG2 (A) , MCF-7 (B) , MCF10A (C)	24
Figura 14. Avaliação do potencial apoptótico/ necrótico da rBpSP-II em MCF-7 por citometria de fluxo.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNO₃ – Nitrato de Prata

AOX1 – Alcohol oxidase

BCA – Albumina de soro bovino

BPP – Peptídeos potencializadores de bradicinina

BMGY – Buffered Glycerol-Complex Medium

BMMY – Buffered Methanol-Complex Medium

CO₂ – Dióxido de carbono

DEP – Isofluorato

EST – *Expressed Sequence Tags*

FPA – Fibropeptídeos A

FPB – Fibropeptídeos B

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HIC – Cromatografia de interação hidrofóbia

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

HPLC-RP – Sistema HPLC em fase reversa

IMAC – Cromatografia de afinidade por ions metálicos imobilizados

INCA – Instituto Nacional de Câncer.

kDa – kiloDaltons

KCl – Cloreto de potássio

KH₂PO₄ – Fosfato de Potássio

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5

Na₂CO₃ – Carbonato de Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaH₂PO₄ – Fosfato de Sódio

Na₂S₂O₃. Tiosulfato de Sódio

Ni²⁺ – Íon Níquel

Ni-NTA – Ácido nitrilotriacético com íon níquel

PBS – Phosphate Buffered Saline

PI – Iodeto de proprídeo

PMSF – fenilmetilsulfonil fluorido

rBpSP-I – Serinoprotease recombinante de *Bothrops pauloensis* – I

rBpSP-II – Serinoprotease recombinante de *Bothrops pauloensis* – II

SBF – Soro Bovino Fetal

SBH – Sociedade Brasileira de Herpetologia

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida

SIM – Sistema de Informações de Mortalidade

SVMs – Snake Venom Metalloproteinases

SVSPs – Snake Venom Serine Proteases

SVTLEs – Snake Venom thrombin-like enzymes

TFA – Ácido trifluoracético

Tris-HCl – Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride

YNB – Yeast Nitrogen Base

1. INTRODUÇÃO

1.1. Serpentes

No mundo, existem mais de 10.700 espécies de répteis. O Brasil, sendo o país que apresenta a terceira maior riqueza de répteis do mundo, conta com 795 espécies dessa classe (UETZ & HOSEK, 2018; BÉRNILS, 2015). A classe Reptilia é composta por 4 ordens: Crocodylia; Rhynchocephalia; Testudines; Squamata. No território brasileiro a maior ordem é a Squamata, representada por 753 espécies, das quais 405 são serpentes. Dessas, 15% são de interesse médico e biotecnológico (MOURA et al., 2010).

As serpentes são um dos grupos dos animais vertebrados mais bem-sucedidos e apesar de possuírem um formato corporal altamente conservado, existe uma grande variedade de colorações e espécies, as quais ocupam diferentes ambientes. Elas preferem ambientes de clima tropical e subtropical, úmidos, como áreas de cultivo e matas com uma grande quantidade de roedores, sua presa natural (CALVETE et al., 2009; LEE & SCANLON, 2002). Esses animais possuem uma relação estreita com os seres humanos desde os tempos mais antigos. Na história da humanidade, as serpentes despertam medo, curiosidade e admiração. Ademais, são fontes de credices populares e simbologias, como a do poder, da morte e da cura (SILVA et al., 2004; SANTOS-FITA e COSTA-NETO, 2007; CARDOSO et al., 2010).

No Brasil, há duas famílias consideradas peçonhentas (Elapidae e Viperidae), uma vez que apresentam glândulas especializadas na produção da peçonha e aparelho inoculador (CARDOSO, 2003).

O acidente ofídico é o quadro de envenenamento decorrente da inoculação de peçonha através do aparelho inoculador das serpentes. Na América do Sul, o Brasil é o país com maior incidência de acidentes ofídicos (Ministério da Saúde, 2018). Em 2013, foram notificados 25.302 casos de acidentes ocasionados por serpentes (Ministério da Saúde, 2014).

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por aproximadamente 80% desses acidentes no país, por isso são amplamente estudadas (DE OLIVEIRA et al., 2008). Esse fato pode estar relacionado ao comportamento dessas serpentes que quando ameaçadas são bastante agressivas, podendo atingir a vítima sem que esta a perceba, pois desferem seus botes sem produzir sons (SANTANA, 2015).

As serpentes botrópicas pertencem à família Viperidae e compreendem cerca de 30 espécies distribuídas por todo território brasileiro (SBH, 2018). Em cada região há um tipo de

espécie predominante (CARDOSO, 2003). As espécies desse gênero mais conhecidas são: *Bothrops atrox*, encontradas no Norte; *Bothrops erythromelas*, encontradas no Nordeste; *Bothrops moojeni* nas regiões Centro-oeste e Sudeste; *Bothrops jararaca*, encontradas na região Sul e Sudeste; *Bothrops jararacuçu*, distribuídas no cerrado e nas florestas tropicais do Sudeste; *Bothrops alternatus*, distribuídas pelo Sul do país; e *Bothrops pauloensis* distribuídas pelo Centro-Oeste, Sul e Sudeste.

A espécie *Bothrops pauloensis* (Figura 1), também conhecida como jararaca pintada e boca de sapo, ocupa principalmente os estados de Tocantins, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Goiás e o Distrito Federal (SBH, 2018). Essa espécie habita ambientes principalmente do cerrado brasileiro, e em zonas geográficas do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, inclusive em áreas modificadas pelo processo de urbanização (VALLE & BRITES, 2008). Ademais, também são encontradas em ocupações agrícolas locais pela facilidade de proliferação de roedores, sua presa natural (MESQUITA, 1997).



Figura 1: Serpente da espécie *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES, 2010).

1.2. Composição das peçonhas de serpentes

As serpentes peçonhentas são aquelas que possuem glândulas especializadas na produção da peçonha e aparelho inoculador para essa substância. Essas glândulas sintetizam, armazenam e secretam biomoléculas, as quais desenvolveram evolutivamente com objetivo de capturar, imobilizar e matar suas presas, além de defender contra seus predadores (KOTCHA, 1996; CARDOSO, 2003).

A peçonha é composta por uma grande variedade de moléculas que possuem diferentes propriedades bioquímicas, estruturais e funcionais. A maior parte desses componentes são

proteínas que possuem atividade enzimática, como metaloproteases, fosfolipases A₂, serinoproteases, L-aminoácidos oxidases e esterases. Além disso, esse coquetel apresenta compostos orgânicos, compostos inorgânicos e componentes não enzimáticos, como lectinas, desintegrinas e peptídeos potencializadores de bradicinina (BPP) (VARANDA & GIANINNI, 1999; KANG et al., 2011; MATSUI et al., 2000). Quando a peçonha é inoculada, essas toxinas podem agir isoladamente ou de forma sinérgica, potencializando seus efeitos locais e sistêmicos nos acidentes ofídicos.

A proporção de cada classe de toxina e a quantidade de peçonha inoculada variam de acordo com a região geográfica, sexo, ontogenética, dieta e idade da serpente (SILVA, 2017; NÚÑEZ et al.; 2009; SUNAGAR et al., 2014; WRAY et al.; 2015). Desse modo, a peçonha de cada gênero possui uma composição variável, o que reflete em diferentes ações, atividades biológicas e efeitos fisiopatológicos. Enquanto a peçonha crotálica é conhecida por apresentar ações neurotóxicas e hemolíticas, a peçonha botrópica é caracterizada por ter um efeito proteolítico e coagulante (UNILUS Ensino e Pesquisa, 2016).

De acordo com o estudo transcriptômico da glândula da peçonha de *Bothrops pauloensis*, 41,9 % do perfil de transcrição corresponde a toxinas (Figura 2), demonstrando seu potencial proteolítico. As toxinas de maior transcrição são as metaloproteases e fosfolipases A₂, representando mais de 60% do total. Outras enzimas, como serinoproteases e L-amino ácido oxidases, são transcritas em menores porcentagens, 5,3% e 2,9%, respectivamente (Figura 2) (RODRIGUES et al., 2012).

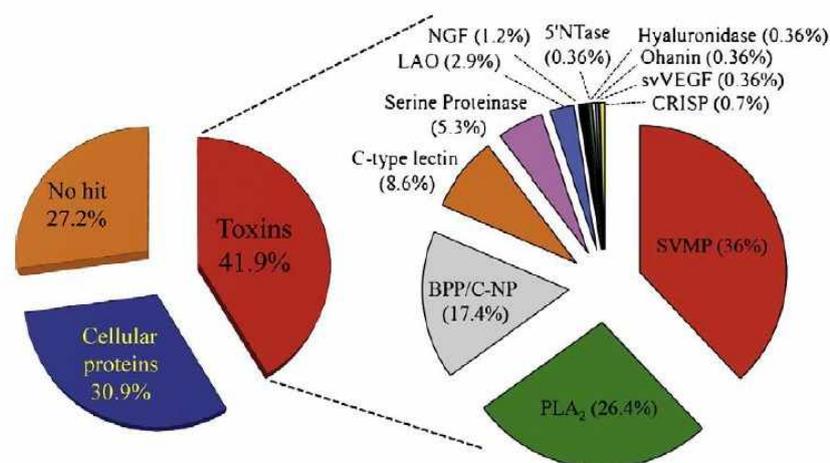


Figura 2: Perfil transcriptômico da glândula da peçonha de *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES et al., 2012).

1.3. Influência dos componentes da peçonha na hemostasia

A hemostasia é um processo muito importante que consiste na regulação tanto da formação do coágulo de fibrina, quanto na dissociação desse coágulo, evitando assim, processos hemorrágicos e trombóticos. Para que o processo hemostático ocorra de forma eficaz diante de uma injúria vascular é necessário que ocorra a vasoconstrição, o que resultará na diminuição do fluxo sanguíneo, e na ativação de plaquetas, de fatores procoagulantes e do sistema fibrinolítico (SAJEVIC et al., 2011). Esse processo é conhecido e representado em forma de cascata (Figura 3) em que precursores inativos vão sendo ativados por ação proteolítica até culminar na formação da trombina, a qual é responsável por clivar o fibrinogênio e formar monômeros de fibrina.

No modelo representado pela cascata de coagulação sanguínea, o processo de formação do coágulo de fibrina pode acontecer de duas maneiras: pela via extrínseca, onde envolve elementos que usualmente não fazem parte da composição intravascular; e pela intrínseca que é iniciada por componentes que estão presentes no espaço intravascular. Essas vias possuem um ponto em comum na cascata que é a ativação do fator X, um fator procoagulante que faz parte do complexo protrombinase (NORRIS, 2003). Esse complexo é responsável pela ativação da trombina, que por sua vez, degrada o fibrinogênio em monômeros de fibrina para a formação do coágulo.

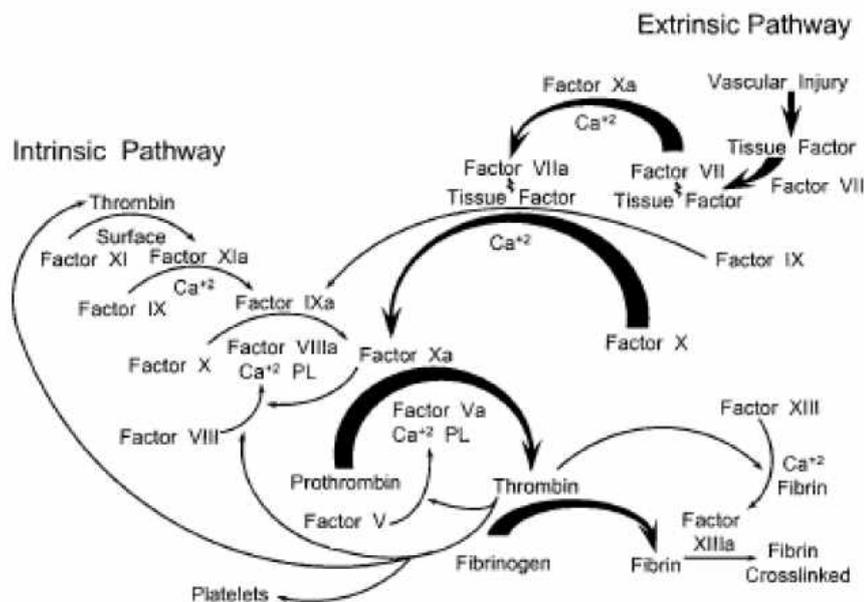


Figura 3: Cascata de coagulação sanguínea, culminando para a formação da trombina (DAVIE, 2003).

Porém, essa hipótese de cascata não consegue explicar alguns eventos e distúrbios observados *in vivo*, razão pela qual uma nova hipótese de como acontece o processo hemostático foi criada e denominada de modelo da coagulação baseado nas superfícies celulares (FERREIRA et al., 2010; HOFFMAN, 2003). Porém, observa-se que os fatores procoagulantes, os elementos que fazem parte do sistema fibrinolítico e os anticoagulantes naturais, são os mesmos nos dois modelos.

Apesar de a presa natural das serpentes serem roedores e animais pequenos, muitas toxinas que compõem a peçonha são altamente ativas em proteínas e elementos celulares do sangue humano, portanto, possuem a capacidade de interferir no processo hemostático. De acordo com a ação e interferência hemostática, essas toxinas podem ser classificadas em: fibrinogenolíticas; fibrinolíticas; ativadoras de plasminogênio; ativadoras da protrombina; ativadoras do fator V; ativadoras do fator X; anticoagulantes, incluindo inibidores da formação do complexo protrombinase e os inibidores de ativadores da trombina; enzimas com atividade hemorrágica; enzimas que degradam os inibidores de serinoproteases; indutores da agregação plaquetária; e inibidores da agregação plaquetária (MARKLAND, 1998).

As serinoproteases e metaloproteases são proteases presentes nas peçonhas ofídicas e são conhecidas por terem a capacidade de interferir em vários pontos do processo hemostático (SAJEVIC et al., 2011; MARKLAND, 1998; MATSUI et al., 2000). Portanto, essas moléculas são alvos de estudos tanto na fisiologia do envenenamento, quanto na terapêutica de distúrbios hemostáticos.

Sabe-se que algumas proteases das peçonhas que interferem na hemostasia clivam as moléculas em alguns pontos de forma inespecífica, porém estudos demonstraram que certas proteases conseguem clivar algumas proteínas de forma específica (MATSUI et al., 2000). Algumas serinoproteases derivadas de peçonhas de serpentes (SVSPs) são estruturalmente e funcionalmente semelhantes aos fatores de coagulação sanguínea, como, por exemplo, as serinoproteases ativadoras da protrombina que clivam a protrombina no mesmo sítio que o fator Xa, convertendo a protrombina em trombina (SAJEVIC et al., 2011).

As SVSPs possuem uma alta capacidade moduladora no sistema hemostático. Além disso, não são degradadas por alguns inibidores de serinoproteases como antitrombina-III (SERRANO; MAROUN, 2005), e isso faz com que essas moléculas sejam altamente estudadas. Além disso, elas podem atuar tanto na estimulação da formação do coágulo, por meio da ativação dos fatores procoagulantes, como fator X, fator V e protrombina, quanto na

dissolução do coágulo de fibrina, agindo na ativação da proteína C e plasminogênio, promovendo uma atividade fibrino(geno)lítica (KINI, 2006; KINI, 2005; TANS; ROSING, 2001; SAJEVIC et al., 2011).

1.4. Serinoproteases

As serinoproteases são altamente distribuídas e encontradas em todos os reinos de vida celular. Elas são conhecidas por participarem de vários processos biológicos, por isso, podem interferir e controlar alguns processos fisiológicos, como o sistema de coagulação, imunidade, apoptose e fertilização (PAGE & DI CERA, 2008).

As SVSPs são classificadas em famílias e clãs, as quais revelam a sua origem evolutiva e seu mecanismo catalítico, respectivamente. Apesar dessas classificações, todas as serinoproteases, possuem um resíduo de Serina reativo no seu sítio ativo que é responsável pelo ataque nucleofílico ao grupo carbonil do substrato, que ocasionará na formação do complexo transitório acil-enzima. Sabe-se que esse perfil nucleofílico, e conseqüentemente, a formação do referido complexo, é estabilizado por outros dois aminoácidos que formarão a tríade catalítica (Figura 4A), composta pelos resíduos de Serina (Ser), Histidina (His) e Aspartato (Asp) (BARRET & RAWLINGS, 1995; KANG et al., 2011; PAGE & DI CERA, 2008).

As serinoproteases derivadas de peçonhas de serpentes são glicoproteínas com sítios N- ou O- ligados e são sintetizadas como zimogênios, possuindo aproximadamente 256 aminoácidos (KANG et al., 2011). Devido às diferenças de quantidades e dos tipos de carboidratos ligados, a massa molecular dessas moléculas pode variar de 26 a 67 KDa. Elas possuem 12 resíduos de cisteína, dos quais 10 são responsáveis pela formação de 5 pontes de dissulfeto, e os 2 resíduos restantes formam uma ponte na extensão C-terminal Cys91–Cys245e (numeração quimiotripsinogênio), que é uma característica das SVSPs (Figura 4B) (SERRANO; MAROUN, 2005; PARRY et al., 1998).

As SVSPs são da família S1 e pertencem ao clã PA (HEDSTROM, 2002; KANG et al., 2011). Isso se deve, pois, essas proteases provavelmente originaram-se de enzimas digestivas, desse modo, apresentam estrutura parecida com a quimiotripsina. A estrutura das serinoproteases quimiotripsina-like (Figura 4B) possui seu sítio ativo localizado na junção de dois domínios assimétricos de folhas β (PARRY et al., 1998). A maioria dessas proteases é sensível a agentes inibidores de serina, como fluoreto de fenilmetano sulfonil (PMSF) e

isofluorofato (DEP). Ademais, elas podem ser inibidas competitivamente pela benzamidina e p-aminobenzamidina (SERRANO; MAROUN, 2005).

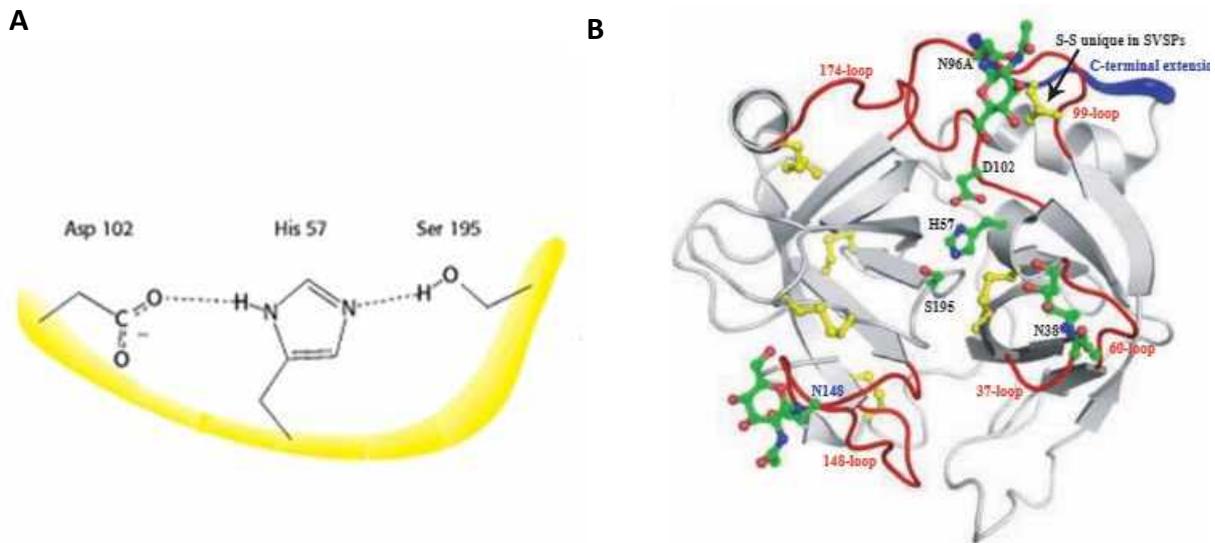


Figura 4: (A) Detalhe do sítio ativo das SVSPs mostrando os resíduos da tríade catalítica Ser195, His57 e Asp102 (JEREMY et al., 2002). (B) Estrutura das SVSPs. Representado pelo azul está a porção C-terminal contendo uma ponte de dissulfeto; as partes coloridas representam as cadeias laterais dos resíduos de His57, Asp102 e Ser195; em vermelho, estão representados os “loops” da molécula; em cinza, estão as α -hélices e as folhas β -pregueadas, e em amarelo, estão representadas as pontes de dissulfeto (KANG et al, 2011).

Algumas dessas serinoproteases possuem a capacidade de realizar algumas funções da trombina, como degradar o fibrinogênio, ativar a proteína C e o fator V (SERRANO; MAROUN, 2005). Elas são chamadas de serinoproteases semelhantes à trombina (SVTLEs), porém há diferenças no sítio de clivagem e na ativação de certos fatores (SERRANO, 2013; YOU et al., 2004).

Nos modelos do processo da coagulação sanguínea, todas as vias culminam na formação da trombina, que é responsável pela degradação do fibrinogênio, liberando igualmente fibropeptídeos A e B que formarão uma matriz insolúvel (CASTRO et al, 2004; CASTRO & RODRIGUES, 2006). Além disso, a trombina ativa o fator XIII que possui a função de realizar ligações cruzadas entre os monômeros de fibrina, formando um coágulo denso e coeso, a evitar a perda de sangue (DI CERA; DANG; AYALA, 1997; POLACK, 2003).

O fibrinogênio é uma glicoproteína dimérica que possui cadeias polipeptídicas chamadas de α , β , γ . As SVTLEs são classificadas em três grupos: SVTLE-AB, SVTLE-A e SVTLE-B, de acordo com os produtos liberados na reação com o fibrinogênio (Figura 5). Algumas SVTLEs são capazes de degradar as cadeias α e β , e assim como a trombina, liberam

fibrinopeptídeos A (FPA) e fibrinopeptídeos B (FPB), sendo classificadas como SVTLE-AB. Porém, a maioria dessas serinoproteases é capaz de clivar apenas uma cadeia do fibrinogênio. Portanto, aquelas que degradam a cadeia β , liberando fibrinopeptídeos B (FPB), são classificadas como SVTLE-B; e as que clivam a cadeia α , liberando fibrinopeptídeos A (FPA), são classificadas como SVTLE-A (CASTRO et al, 2004; CASTRO & RODRIGUES, 2006).

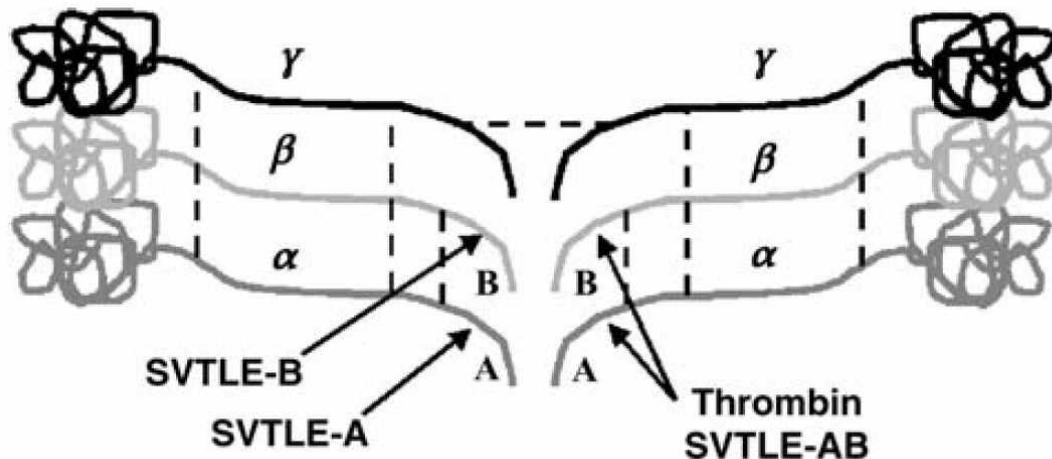


Figura 5: Representação do fibrinogênio e comparação do padrão catalítico de trombina e SVTLEs. Os símbolos α ; β ; γ representam as cadeias de fibrinogênio, já as letras A e B referem-se aos fibrinopeptídeos que são liberados na ação dessas proteases (CASTRO et al, 2004).

Outra diferença é que as SVTLEs não ativam o fator XIII, resultando, conseqüentemente, na formação de um coágulo frouxo, fraco, que será rapidamente degradado e removido pelo sistema fibrinolítico, melhorando o fluxo sanguíneo e diminuindo o estoque de fibrinogênio *in vivo*. Essa característica é responsável por essas moléculas possuírem um efeito coagulante *in vitro*, porém *in vivo* o resultado é um efeito desfibrinogenante. Desse modo, essas proteases possuem um efeito terapêutico anticoagulante e antitrombolítico, portanto, podem servir como um modelo de fármaco para certos distúrbios hemostáticos, como a trombose (MARKLAND, 1998).

1.5. Potencial terapêutico

O Brasil possui uma crescente expectativa quanto ao desenvolvimento biotecnológico utilizando produtos naturais, tendo em vista a grande biodiversidade da fauna, da flora e da exploração de forma benéfica, segura e consciente desses recursos. Muitas vezes esses

produtos naturais são moléculas isoladas de peçonha de serpentes (UNILUS Ensino e Pesquisa, 2016).

Diversos estudos comprovam que moléculas isoladas de peçonhas de algumas serpentes encontradas em território brasileiro possuem ação antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, anticoagulante, antitumoral, entre outras (Figura 6) (GADERNAL, 2010; BURIN et al., 2018; SAMY, SETHI, LIM, 2016). Portanto, os estudos sobre a composição dessas peçonhas despertam interesse tanto em sua atuação no envenenamento, quanto na aplicação terapêutica de suas moléculas isoladas.

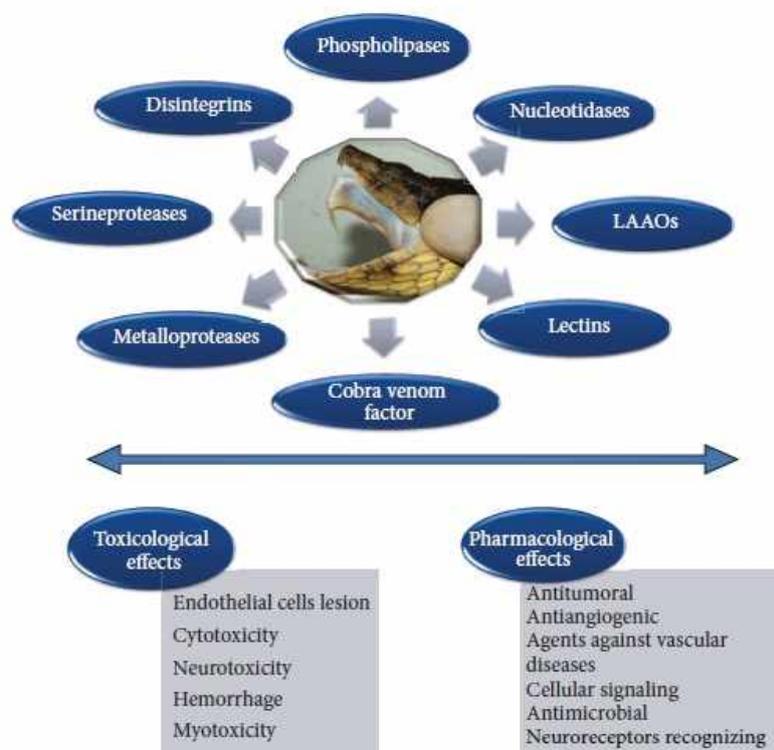


Figura 6: Amplo espectro de ações toxicológicas e aplicações terapêuticas de toxinas derivadas de peçonhas de serpentes (CALDERON et al., 2014).

Um exemplo de como algumas moléculas isoladas de peçonha de serpentes podem ser potenciais terapêuticos é o Captopril. Esse fármaco é o primeiro em que o princípio ativo é derivado da peçonha de uma serpente. Estudos dos mecanismos fisiológicos do envenenamento constataram que a peçonha de *Bothrops jararaca* quando inoculada tinha a ação de causar uma hipotensão em suas presas. Essa ação foi atrelada ao fato dessa peçonha conter moléculas denominadas peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs) (GUERREIRO, 2009).

A cola de fibrina derivada de serinoproteases isoladas de *Crotalus durissus* pode ser usada em tratamentos de distúrbios hemorrágicos e como cicatrizante de feridas, uma vez que ela possui propriedades reparadoras nos tecidos (BARROS et al., 2009). Este composto é muito útil para manter a hemostasia em alguns tipos de cirurgia e para terapias regenerativas, como na reparação do tecido neural (BUCHAIM et al., 2015; SPOTNITZ, 2014). Um exemplo disso, é o estudo que demonstrou que a cola de fibrina viabiliza a regeneração axonal, bem como, é um método eficiente para recuperar nervos periféricos lesados (BUCHAIM et al., 2015). A cola de fibrina é biodegradável, não imunogênica, não é vetor de doenças, não é tóxica, não produz efeitos colaterais e possui propriedades adesivas. (BUCHAIM et al., 2015).

Devido às propriedades desfibrinogênicas das SVTLEs elas são alvos potenciais terapêuticos no enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral isquêmico e doenças trombóticas. Além disso, essas proteases também são estudadas para serem usadas na prevenção de formação de trombos e em melhorar a circulação sanguínea em vários distúrbios vasculares, reduzindo a viscosidade do sangue (CASTRO et al, 2004). A Batroxobin (Reptilase®) é uma SVTLEs isolada da peçonha de *Bothrops atrox*, que cliva a cadeia α do fibrinogênio, convertendo-o em monômeros soltos de fibrina. Logo, esse fármaco apresenta um bom efeito terapêutico no tratamento da isquêmica em ratos e em práticas clínicas *in vivo* (FUNK et al, 1971). Da mesma forma, a metaloprotease denominada Moojenin (Defibrase®) isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* mostrou atividade anticoagulante por clivar cadeias α e β do fibrinogênio, formando um coágulo instável (WANG et al, 2001). Ambas SVTLEs são insensíveis aos inibidores da trombina e agem especificamente sobre o fibrinogênio, não afetando a função plaquetária.

Compostos orgânicos e naturais são fontes promissoras na formulação de drogas antitumorais. Muitos peptídeos e proteínas derivados de peçonhas das serpentes demonstraram propriedades anti-angiogênicas e anti-metastáticas, afetando a migração e a proliferação de células tumorais, o que comprova que estas toxinas podem se ligar de forma específica às membranas das células cancerosas.

Existem muitos estudos publicados descrevendo o potencial antitumoral das toxinas de serpentes. Peçonhas de diferentes espécies, *Ophiophagus hannah* e *Echis carinatus*, foram testadas quanto às suas propriedades antitumorais usando células tumorais pancreáticas. Essas peçonhas apresentaram ação citotóxica, além de atividade inibitória da angiogênese

(KERKKAMP et al., 2018). Algumas metaloproteases derivadas de peçonhas das serpentes (SVMPs) demonstraram atividade de inibição do processo de angiogênese e de indução da apoptose. Uma metaloprotease PI isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* foi capaz de inibir a adesão de células tumorais e a formação de capilares em Matrigel, demonstrando seu potencial inibitório da angiogênese. Além disso, essa protease apresentou efeitos citotóxicos em concentrações maiores que 20 µg/mL (ACHÊ et al., 2015). Uma L- amino oxidase isolada da peçonha de *Bothrops leucurus*, denominada BI-LAAO apresentou citotoxicidade sobre várias linhagens tumorais, como células tumorais de estômago (MKN-45) e células tumorais colorretal (RKO). Observou-se que essa citotoxicidade se deve à geração de grandes quantidades de H₂O₂ (NAUMANN et al, 2011). Outro exemplo é efeito antitumoral e anti-angiogênico em células de câncer de mama MDA-MB-231 induzidas pela Bothropoidina, uma metaloprotease isolada da peçonha da *Bothrops pauloensis* (GUIMARÃES et al., 2017); e efeitos antitumorais de uma BnSP-6, uma Fosfolipase A₂ Lys 49 isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, em células MDA-MB-231 de câncer de mama humano (AZEVEDO et al., 2016).

1.5.1. Câncer

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células que invadem órgãos e tecidos. Essas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, pois dividem-se rapidamente, podendo espalhar-se para outras regiões. O câncer pode ter origem de diferentes tecidos e células (INCA, 2018).

As células cancerosas são caracterizadas pelo crescimento celular descontrolado, perda da capacidade apoptótica e pela capacidade de fazer metástase, o qual é um processo que pode induzir adesão celular, migração através da matriz celular e angiogênese (VYAS et al., 2013; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O câncer é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), 12,7 milhões de pessoas no mundo são diagnosticadas com câncer, sendo que, 7,6 milhões morrem vítimas dessa doença. A estimativa é que em 2030 haverá 26 milhões de casos novos e 17 milhões de mortes por ano. De acordo com o Ministério da Saúde, usando dados referentes a 2015, o câncer já é a principal causa de morte em 10% dos municípios brasileiros, superando as doenças cardiovasculares. O câncer de mama no Brasil é o mais decorrente entre a população feminina e a maior causa de morte entre elas. De acordo com o Sistema de Informações de

Mortalidade (SIM), aproximadamente 14.206 mulheres são vítimas dessa doença, por ano, no Brasil (INCA). Em 2018, houve a estimativa de 59.700 mil novos casos de câncer de mama entre as mulheres (INCA, 2017).

A otimização dos tratamentos atuais e busca de novas abordagens e tratamentos contra o câncer são alguns dos principais desafios que a pesquisa na área médica mundial tenta solucionar. Os tratamentos atuais causam muitos efeitos colaterais e são caros, gerando drásticas consequências econômicas, físicas e mentais (VYAS et al., 2013). O tratamento atual contra as neoplasias pode ser feito por cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou transplante de medula óssea. Essas abordagens podem atuar isoladamente, mas muitas vezes é preciso uma combinação delas. Pacientes em tratamento quimioterápico relatam diversos efeitos colaterais, como dor, náuseas, vômito, queda de cabelo, ansiedade, fadiga e alterações de peso. Alguns pacientes desistem do tratamento porque o consideram muito agressivo (BATISTA et al., 2015). Portanto, são necessários estudos e pesquisas que objetivam novas abordagens para o tratamento do câncer, que diminuam esses efeitos colaterais, aumentando a qualidade e o tempo de vida desses pacientes.

Muitos estudos estão propondo uma relação entre a hemostasia e o câncer, sugerindo que um distúrbio associado com as proteínas da coagulação do sangue favorece a progressão do tumor (FALANGA; MARCHETTI; VIGNOLI, 2013; DUARTE, 2007). Sabe-se que a neovascularização, conhecida como angiogênese, é um processo fundamental para a nutrição das células tumorais e que favorece a migração dessas células à circulação sistêmica. Componentes responsáveis pela promoção da coagulação sanguínea estão presente em situação onde há o remodelamento vascular, logo, esse sistema pode contribuir para a formação de novos vasos sanguíneos, favorecendo a angiogênese nos pacientes que são vítimas do câncer. Desse modo, muitos desses pacientes apresentam hipercoabilidade com risco de 4,2 vezes mais de desenvolver trombose venosa. Além disso, o risco de trombose é aumentado com tratamento antineoplásico devido à ação citotóxica com danos no endotélio, que libera substâncias procoagulantes e citocinas responsáveis para ativação da coagulação sanguínea (DUARTE, 2007). Assim, um tratamento antitrombótico é uma alternativa para prevenir trombose em pacientes com câncer. Levando em conta que estes pacientes apresentam anormalidade na hemostasia, levando-os para estados hemorrágicos e trombóticos, o desenvolvimento de abordagens bifuncionais seria uma boa alternativa para agir sobre o processo maligno, resolvendo a deficiência na coagulação (LIMA; MONTEIRO, 2013).

1.6. Expressão heteróloga

A produção de proteínas heterólogas é uma tecnologia que está sendo usada em diversas áreas, como terapêutica, veterinária, agropecuária, alimentícia, cosmética e na produção de antígenos vacinais, entre outras. Essa técnica pode ser feita por vários sistemas de expressão como bactérias, leveduras, plantas, células de mamíferos e de insetos (DINIZ; FERREIRA, 2010). A escolha do sistema de expressão dependerá da situação financeira, do objetivo do trabalho e, principalmente, das características e exigências da molécula de interesse.

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* é um sistema de expressão conhecido por ser usado principalmente na produção de biofármacos e enzimas industriais. Estudos atuais vêm mostrando que sistemas eucariotos, como a *Pichia pastoris*, são um bom sistema de expressão, pois conseguem realizar modificações pós-traducionais, tais como, o processamento de sequências sinal; dobramento; formação de pontes dissulfeto; adição de certos lipídios; e glicosilações. Essas modificações podem ser necessárias para a atividade funcional da proteína (CEREGHINO & CREGG, 2000). Além disso, essa levedura não é considerada como fermentadora. O etanol é um dos produtos da fermentação que em grandes concentrações pode ser tóxico às células, afetando o rendimento da indução (CEREGHINO et al., 2002).

Outra característica importante é que um forte promotor, derivado do gene do álcool oxidase (AOX1) de *P. pastoris*, é usado para transcrever genes heterólogos, o qual permite uma transcrição eficiente e rendimentos desejáveis das moléculas de interesse. Para ele ser ativado é necessário a presença de metanol e, na ausência desse indutor, ele se torna reprimido. Isso contribui para o controle e facilidade do sistema tanto na escala laboratorial quanto na escala industrial (TORRES & MORAES, 2000). Além disso, sabe-se que o sistema de expressão eucariótico secreta as proteínas para o meio extracelular, isso faz com que a purificação seja mais simples (KRAINER et al., 2016, STADLMAYR et al., 2010).

1.7. Serinoprotease recombinante de *Bothrops pauloensis* – II (rBpSP-II)

Apesar da grande influência das serinoproteases em distúrbios hemostáticos, estudos de transcriptoma feitos com a glândula da peçonha da *Bothrops pauloensis* revelaram que somente 5,3% das toxinas totais correspondem a serinoproteases (Figura 2) (RODRIGUES et al., 2012). Esses estudos permitiram a geração de sequências ESTs (*Expressed Sequence Tags*), que são de grande valia para a elucidação da complexidade e variabilidade das toxinas presentes na peçonha de *B. pauloensis*. Nesse mesmo estudo foram identificadas dois *clusters*

de serinoproteases, as quais foram depositadas em bancos de dados e denominadas de rBpSP-I (GR955261) e rBpSP-II (GR955260).

Essas proteases foram obtidas a partir do cDNA da peçonha de *B. pauloensis*, e ambas as proteínas foram clonadas em vetor pPICZ α A (Figura 7), o qual, posteriormente, foi inserido no genoma da levedura *Pichia pastoris*, cepa KM71H, para ensaios de expressão da proteína recombinante.

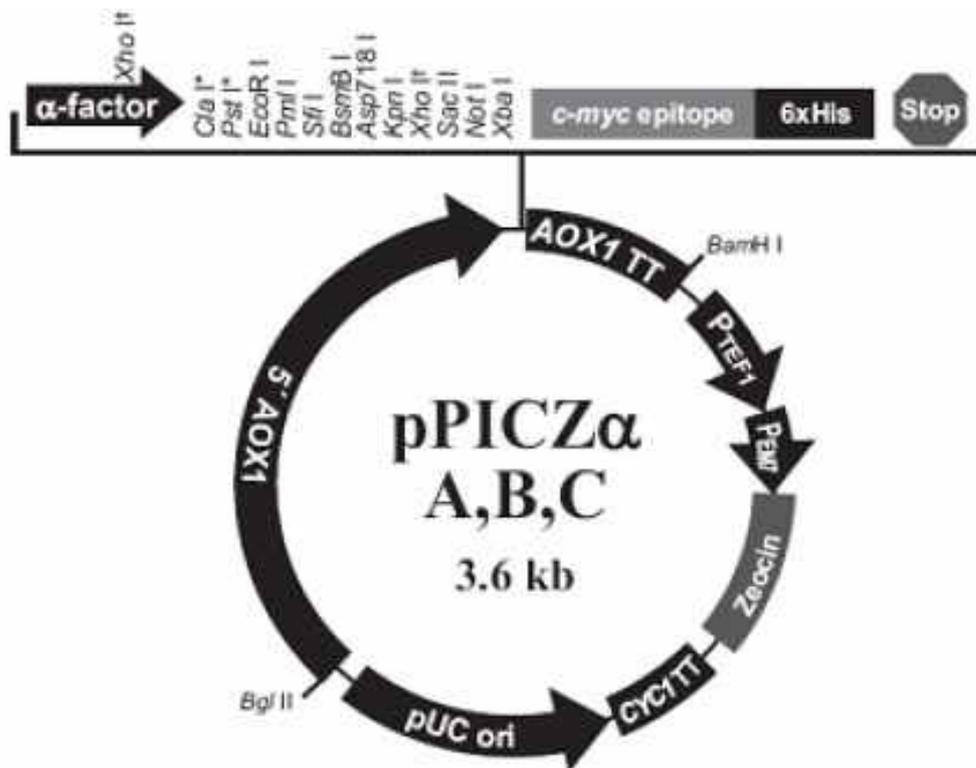


Figura 7. Vetor de expressão pPICZ α A (Invitrogen) utilizado para a clonagem das proteínas de interesse obtidas da biblioteca de cDNA (RODRIGUES et al., 2012).

O vetor pPICZ α A apresenta uma região de resistência ao antibiótico zeocina, uma região denominada α -fator responsável pelo direcionamento da proteína recombinante para o sobrenadante e uma região composta pelo promotor AOX1 que é induzido pela presença de metanol no meio. Além disso, aos cDNAs de ambas proteínas (rBpSP-PI e rBpSP-II) foram adicionados uma cauda contendo 6 resíduos de histidina, para facilitar a purificação da proteína de interesse (ISABEL et al., 2016).

Portanto, com o auxílio de novas técnicas no campo da biologia molecular, biotecnologia e bioinformática, a produção de uma serinoprotease recombinante “thrombin-like”

denominada rBpSP-II e estudos funcionais e estruturais da mesma, podem ser modelos moleculares para a formulação de fármacos que podem ser agentes terapêuticos no tratamento de câncer ou em distúrbios hemostáticos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral expressar uma serinoprotease recombinante (rBpSP-II) de *Bothrops pauloensis* em *Pichia pastoris* e avaliar a sua atividade citotóxica sobre diferentes linhagens tumorais.

2.2. Objetivos específicos

- Expressar uma serinoprotease clonada da peçonha de *B. pauloensis*, denominada de rBpSP-II, em *Pichia pastoris*;
- Purificar a rBpSP-II por cromatografia de afinidade em Ni-NTA e HPLC;
- Analisar a proteína recombinante em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5%;
- Realizar o ensaio de viabilidade celular por 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 (MTT) sobre as seguintes linhagens tumorais: HepG2, MCF-7, MCF10A;
- Avaliar a indução de morte celular por apoptose/necrose, sobre a linhagem MCF-7 por citometria de fluxo;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Expressão da serinoprotease recombinante da peçonha de *Bothrops pauloensis* (rBpSP-II).

Inicialmente foi feito um pré-inóculo com uma colônia positiva contendo o inserto da serinoprotease rBpSP-II em um erlenmeyer de 125mL com 10mL de meio BMGY (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1,34% YNB, 4×10^{-5} biotina, 1% glicerol, 100mM fosfato de potássio pH 6.0) por 17 horas a 30°C com agitação de 200rpm. Posteriormente, toda a cultura foi transferida para erlenmeyer de 2L contendo 500mL de meio BMGY e incubada a 30°C com agitação de 200 rpm. Após 24 horas, a cultura foi centrifugada a 1500xg por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 100mL de meio BMMY (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1,34% YNB, 4×10^{-5} biotina, 0,5% metanol, 100mM fosfato de potássio pH 6.0) em um erlenmeyer de 1L a 26°C com agitação de 190rpm. A indução da proteína recombinante foi promovida pela adição de metanol 100% à cultura para uma

concentração final de 0,75% a cada 24 horas (AOKI et al., 2003). Foram coletadas alíquotas de 400µL antes de cada adição de metanol para posterior análise dos tempos em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% (LAEMMLI, 1970).

Após 96 horas a cultura restante foi centrifugada a 1500xg por 10 minutos, posteriormente, o sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana de 0,45µm. Esse sobrenadante filtrado foi usado para a purificação da serinoprotease recombinante.

3.2. Purificação da serinoprotease recombinante de *Bothrops pauloensis* em resina de níquel Ni-NTA Superflow

A proteína recombinante expressa contendo uma sequência de seis resíduos de histidinas na porção C-terminal foi submetida a purificação em uma cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA Superflow (Qiagen®). A resina de níquel foi previamente lavada com 3 volumes (15mL) de água destilada e em seguida equilibrada com 5 volumes do tampão de lise (Tris-HCl 0,01M; NaH₂PO₄ 0,06M e NaCl 0,01M; pH 8,0). Após este procedimento, o sobrenadante da cultura induzida, previamente filtrado, foi aplicado à resina e em seguida foi realizada a lavagem da coluna com 3 volumes de tampão de lise. Para remover as proteínas ligadas por afinidade à coluna foi utilizado um tampão de eluição (Tris-HCl 0,01M; NaH₂PO₄ 0,06M; NaCl 0,1M pH 8,0) com diferentes concentrações (10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM) de imidazol. Frações de 5 mL foram coletadas manualmente e analisadas por SDS-PAGE a 12,5% (LAEMMLI, 1970).

As frações coletadas correspondem ao gradiente 1A, 1B (10mM de imadazol); 2A, 2B (25mM de imidazol); 3A, 3B (50mM de imidazol); 4A, 4B (75mM de imidazol); 5A, 5B (100mM de imidazol); e 6A, 6B e 6C (250mM de imidazol).

3.3. Cromatografia de Fase Reversa (C18) em sistema HPLC (HPLC-RV)

Aproximadamente 2,5mg derivado das frações eluídas pela purificação em resina de níquel Ni-NTA Superflow foram aplicados em uma coluna Partisphere C18 WHATMAN® (4,6mm x 125mm) de volume 1,66mL acoplada ao cromatógrafo ÄKTApurifier (GE HealthCare). A coluna foi equilibrada com o solvente A (ácido trifluoracético 0,1% v/v e acetronitrila 5% v/v), em seguida a proteína de interesse foi eluída da coluna utilizando o solvente B (ácido trifluoracético 0,1% v/v e acetronitrila 100%). A eluição das amostras ocorreu a um fluxo de 1 mL/min a temperatura ambiente. As frações foram coletadas, liofilizadas e armazenadas a - 80°C.

3.4. Determinação da concentração proteica

As dosagens de proteínas em soluções foram realizadas utilizando o método estabelecido por Bradford (1976). As determinações das concentrações de proteínas foram realizadas em triplicata e a leitura da absorbância em 595nm. Paralelamente à dosagem de proteínas foi construída uma curva padrão de albumina do soro bovino (BCA) (2mg/mL). A concentração de proteínas ug/uL foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos na curva padrão.

3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)

A eletroforese com agente desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizada segundo a técnica descrita por Laemmli (1970).

Para monitorar a expressão e determinar a massa molecular da proteína recombinante as amostras foram dissolvidas em tampão STOP (Tris-HCl 0,06M, pH 6,8, azul de bromofenol 0,001% (m/v), glicerol 10% (v/v) e β -mercaptoetanol 10% (v/v)), em seguida, estas amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos em banho-maria, aplicadas em gel e a eletroforese conduzida a 12mA e 300V até o indicador azul de bromofenol atingir o final do gel.

Ao final deste procedimento, os géis foram submetidos à coloração com nitrato de prata segundo Bassam et al., (1991). Esta metodologia consiste em deixar o gel *overnight* em solução de 50% de metanol, 12% de ácido acético e 0,05% de formaldeído. Posteriormente, o gel foi lavado com etanol 50% por 3 vezes de 20 minutos cada e colocado em uma solução de pré-tratamento com tiosulfato de sódio 0,02% ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) por exatamente 1 minuto. Na sequência, o gel recebeu 3 enxágues de 20 segundos cada, com água destilada e foi colocado em uma solução de nitrato de prata (AgNO_3) por 20 minutos, sendo posteriormente enxaguado 3 vezes por 20 segundos com água destilada. O gel foi revelado com solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e a reação foi interrompida com solução de 50% de metanol e 12 % de ácido acético.

3.6. Manutenção das linhagens celulares aderentes (HepG2, MCF-7 e MCF10A)

Foram utilizadas as linhagens celulares imortalizadas descritas a seguir: adenocarcinoma de mama humana (linhagem MCF-7), células epiteliais de mama não tumorigênica humana (MCF10A) e hepatocarcinoma humano (linhagem HepG2). As linhagens HepG2 (ATCC number HB-8065), MCF-7 (ATCC number HTB-22) e MCF10A (ATCC number CRL-10317) foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido (-195°C) em alíquotas de 1×10^6

células/mL em solução de congelamento (10% de DMSO em soro bovino fetal). Para a realização dos experimentos as células foram descongeladas e cultivadas em monocamada, em frascos de 25cm² com 5mL de meio de cultura DMEM (Gibco 31600- 034, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). Os frascos contendo as células descongeladas foram incubados em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C, até atingirem o estado de confluência (~ 5x10⁶ células), quando necessitam de subcultivo.

3.7. Subcultivo da HepG2, MCF-7 e MCF10A

Todo o sobrenadante do frasco obtido no item anterior foi desprezado, permanecendo assim, somente as células aderidas ao fundo do frasco. O frasco foi lavado com aproximadamente 6mL de tampão PBS (Phosphate Buffer Saline – Na₂HPO₄ 3,2mM; KH₂PO₄ 0,5mM; KCl 1,3mM; NaCl 35mM) estéril pH 7,4 que posteriormente foi descartado. Em seguida, adicionou-se 2mL de tripsina 0,25% (SAFC Bioscience 59429C, USA) à garrafa de cultura. O período de ação da tripsina é de aproximadamente 5 minutos e após este período, a mesma foi neutralizada com meio DMEM com SBF 10%, de modo que o volume de meio fosse o dobro do volume usado de tripsina. Realizada essa etapa, transferiu-se todo o conteúdo para um tubo falcon de 15mL e centrifugou-se por 5 minutos a 900xg. Desprezou-se todo o sobrenadante, sendo o pellet ressuspensionado em DMEM com SBF 10%. Em seguida, foi feita a contagem do número de células em contador automático (Countess II FL Automated Cell Counter Invitrogen) na presença do corante azul de Tripán, depois a suspensão celular foi distribuída em garrafas 75cm² com 10mL de meio de cultura DMEM com SBF 10%, de modo que cada garrafa recebesse 1x10⁶ células. Novamente as garrafas foram incubadas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C, até atingirem o estado de confluência, quando necessitam de novo subcultivo. Os ensaios com a proteína recombinante (rBpSP-II) foram executados com células entre o 3° e 6° subcultivo.

3.8. Ensaio de citotoxicidade (MTT)

Para o teste de citotoxicidade foram utilizadas placas de 96 poços, de modo que os 3 primeiros poços foram utilizados para a leitura do branco e portanto, não receberam células ou tratamento. O restante dos poços receberam 5x10⁴ células/poço, com um volume final de 150µL. As células foram plaqueadas (HepG2, MCF-7 e MCF10A) e incubadas por 24 horas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C. Depois desse período as células foram tratadas com 50 µL de PBS (controle negativo) ou diferentes concentrações de

rBpSP-II (0,2 a 100µg/mL) e novamente incubadas por 24 horas à 37°C com 5% de CO₂, até a análise. O controle positivo recebeu 50µL de cisplatina (Incel - Darrow®) na concentração 0,25mg/mL). Após 24 horas de tratamento, os poços receberam 20µL de 3-(4,5-dimetil tiazol 2-il) 2,5- difenil brometo de tetrazolium (MTT) (Sigma M2128, USA) e foram incubados por 4 horas à 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, as placas foram centrifugadas por 10 minutos a 900xg e posteriormente invertida para o descarte do sobrenadante, seguida da adição de 100µL de DMSO (Sigma D2650, USA) em cada poço, e mantidas sob agitação até a total dissolução dos cristais (aproximadamente 20 minutos). Em seguida, as placas foram levadas ao espectrofotômetro para a leitura da absorbância em 570nm. Foram realizados 3 experimentos independentes, em triplicatas, para cada concentração. Os dados obtidos foram transferidos para o software GraphPad Prism 5, onde os gráficos foram gerados e realizou-se a análise estatística para interpretação dos dados.

3.9. Análise de apoptose/necrose por citometria de fluxo

Em placas de 24 poços, foram adicionadas 1x10⁶ células/poço com volume final de 950 µL. As linhagens celulares foram plaqueadas e tratadas com 50µL de diferentes concentrações de rBpSP-II (0,78; 6,25 ou 50µg/mL). O controle negativo contendo 50µL de meio de cultura. Após 24 horas de tratamento, as células foram recolhidas dos poços, transferidas para tubos de citometria, e centrifugadas por 5 minutos a 400xg, sendo o sobrenadante desprezado, o pellet ressuscitado e adicionado 1mL de PBS. Em seguida, as células foram centrifugadas novamente nas mesmas condições, o sobrenadante foi desprezado, o pellet ressuscitado e adicionados 200µL de tampão 1X de Anexina V. Foram adicionados 1µL de Anexina V FITC em cada tubo. As amostras foram incubadas por 15 minutos em banho de gelo e logo após a incubação, foram adicionados 2µL de iodeto de propídeo (PI) e imediatamente realizou-se a leitura. Foram analisados 10.000 eventos no equipamento FACSCanto (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Foram realizados 3 experimentos independentes com triplicatas para cada concentração. Os dados obtidos foram transferidos para o software GraphPad Prism 5, onde os gráficos foram gerados e realizou-se a análise estatística para interpretação dos dados.

4. RESULTADOS

4.1. Expressão e Purificação da serinoprotease recombinante da peçonha de *Bothrops pauloensis*

Após os processos de identificação das sequências geradas pelo transcriptoma da glândula da peçonha de *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES et al., 2012), amplificação do cDNA da serinoprotease rBpSP-II, clonagem e confirmação dos clones positivos (ISABEL et al., 2016), foi realizada a expressão da serinoprotease recombinante usando uma colônia positiva contendo o inserto da rBpSP-II. Essa expressão heteróloga foi feita em três etapas: pré-inóculo, geração de biomassa e indução.

A cada 24 horas, 400 μ L foi coletado do meio de indução BMMY. Essas alíquotas, correspondentes aos tempos de indução de 0; 24; 48; 72 e 96 horas, foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5% para a análise da expressão e corados com nitrato de prata para determinação dos níveis de expressão da rBpSP-II (Figura 8).

De acordo com a Figura 8, observou-se que a proteína de interesse rBpSP-II foi expressa de forma gradativa e eficiente. A seta vermelha apresentada na figura indica que a protease começou a ser expressa depois de 24 horas após o começo da indução, possuindo o maior nível de expressão em 96 horas.

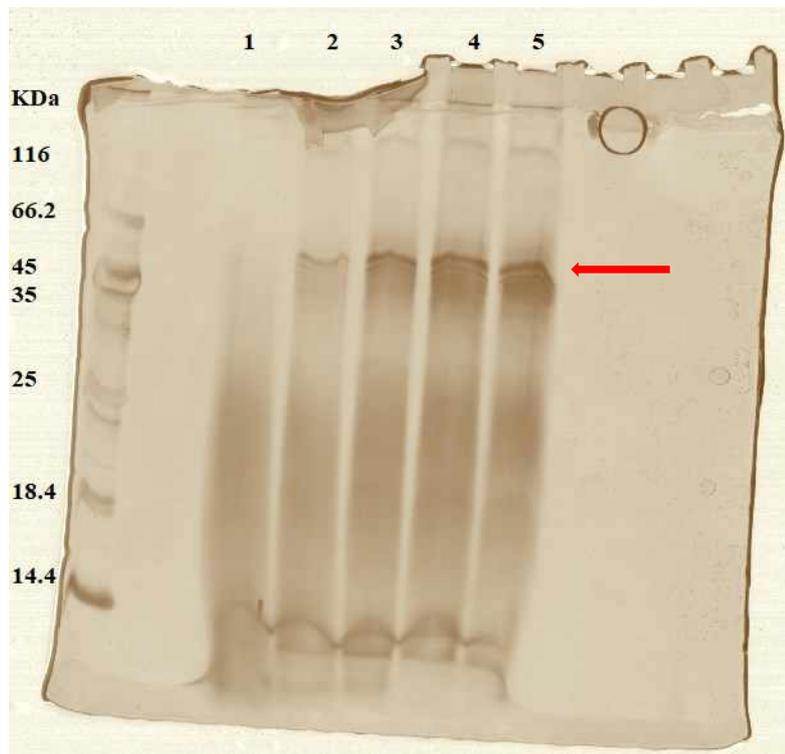


Figura 8: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% da expressão da rBpSP-II em levedura *P. pastoris* em meio BMMY pH 6,0. 1: 0h, 2: 24h, 3: 48h, 4: 72h, 5: 96h. A seta em vermelho indica a proteína recombinante.

Após 96 horas de indução, o meio BMMY foi centrifugado e o sobrenadante foi coletado, filtrado e aplicado na coluna em resina de níquel Ni-NTA Superflow para purificação da rBpSP-II, uma vez que a proteína recombinante possui uma cauda de histidina. Para análise das amostras previamente cromatografadas, foi feito um gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% em que as amostras aplicadas no gel correspondiam às frações coletadas (Figura 9).

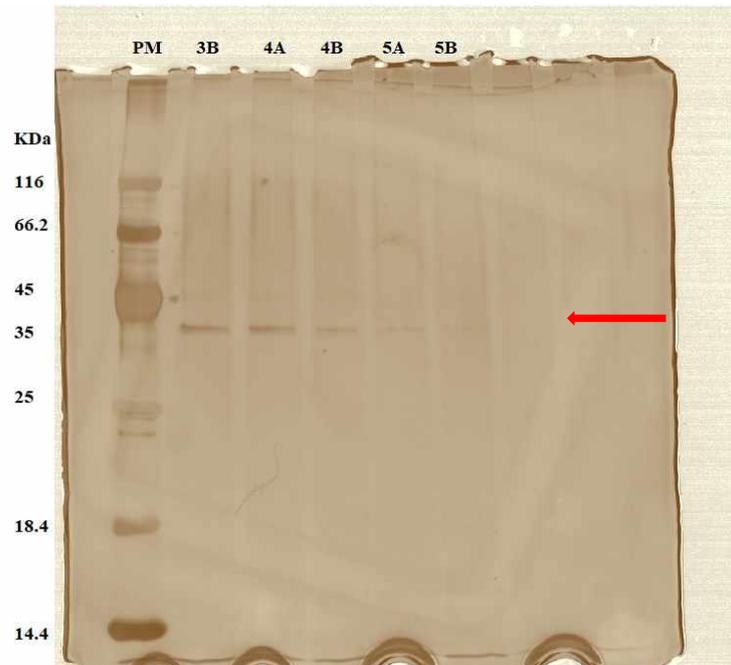


Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% da purificação da rBpSP-II em resina de níquel Ni-NTA Superflow. Foram aplicadas 3uL de padrão de massa molecular; 20uL dos gradientes 3B; 4A; 4B; 5A; 5B. A seta em vermelho indica a proteína recombinante.

Como visto na Figura 9, a rBpSP-II apresentou um grau de pureza satisfatório utilizando a resina de níquel Ni-NTA Superflow. Observou-se que a rBpSP-II, com aproximadamente 45 kDa, foi eluída nos gradientes 3B, 4A, 4B, 5A e 5B (Figura 9). A eluição do gradiente 3 foi obtida usando um tampão de eluição com 50mM de imidazol, do gradiente 4 foi de 75mM de imidazol e por fim do gradiente 5 foi de 100mM de imidazol.

4.2. Purificação por HPLC-RP

A fim de facilitar a obtenção, diálise e concentração da serinoprotease recombinante, após o fracionamento em resina de níquel, utilizou-se o Centricon. Ao colocar no gel SDS-PAGE 12,5% as amostras obtidas depois da realização do processo de concentração, observou-se que as frações eluídas pela cromatografia de afinidade não estavam totalmente puras (Figura 10).

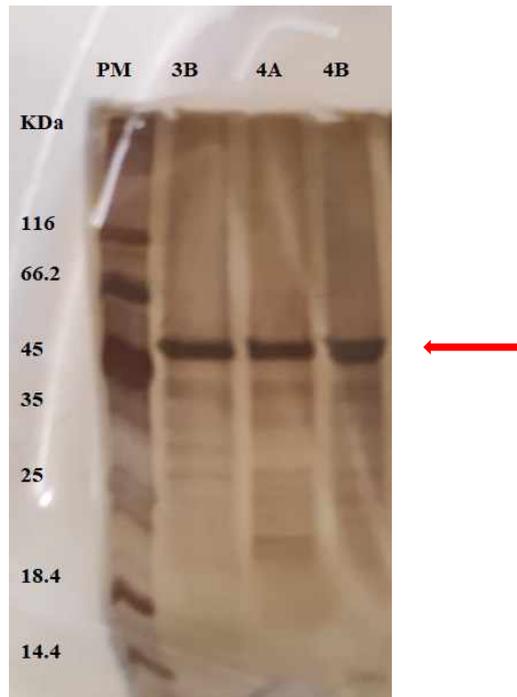


Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%, após um processo de diálise e concentração das frações 3B, 4A e 4B, obtidas da purificação da rBpSP-II em resina de níquel Ni-NTA Superflow, utilizando o Centricon. A seta em vermelho indica a proteína recombinante.

Com o objetivo de purificar a rBpSP-II e eliminar os contaminantes, uma nova estratégia foi traçada. Para isso, foi feita uma cromatografia de Fase Reversa (C18) em sistema HPLC. Esse processo cromatográfico é um tipo de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), na qual as proteínas são separadas de acordo com as diferenças hidrofóbicas. As proteínas mais hidrofílicas são eluídas primeiro, enquanto as mais hidrofóbicas são eluídas por último.

As frações eluídas na cromatografia de afinidade (2,5mg) foram reunidas e fracionadas em sistema de HPLC em fase reversa (HPLC-RP) utilizando uma coluna C18 (Figura 11), resultando em 16 frações proteicas e peptídicas.

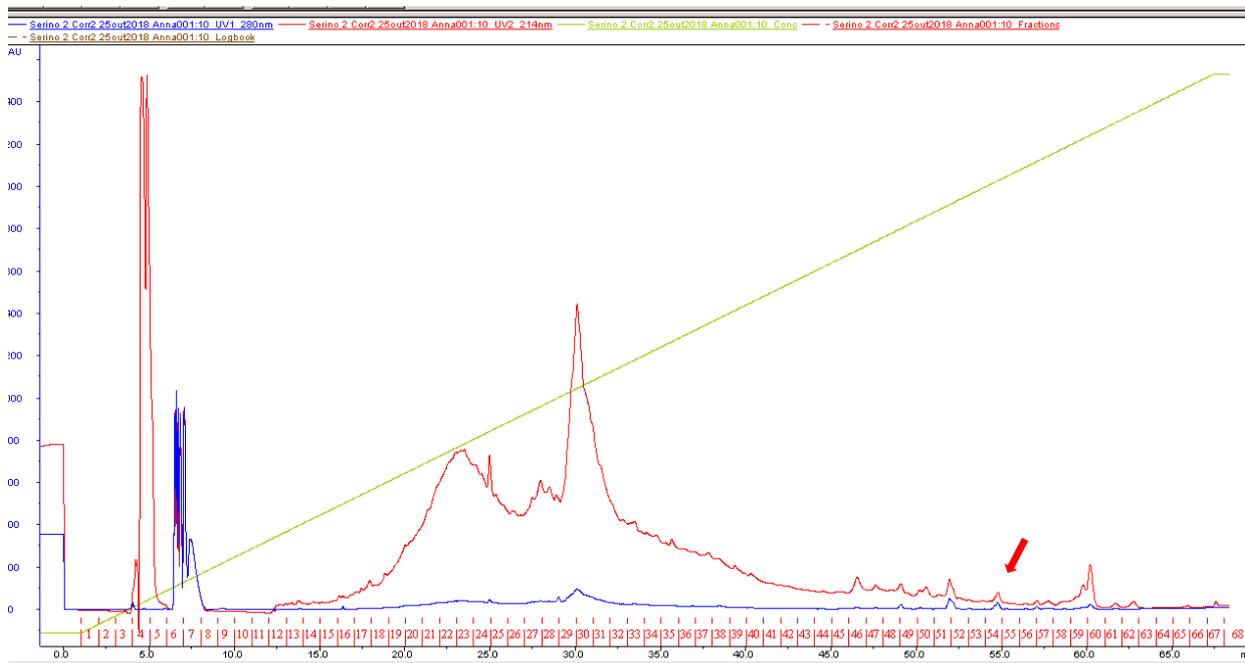


Figura 11: Fracionamento das frações eluídas pela cromatografia de afinidade (2,5mg) em HPLC-RP.

Com o intuito de verificar a fração que continha a serinoprotease de interesse (rBpSP-II), todas as frações coletadas após a purificação, foram analisadas em gel de poliacrilamida 12,5% (Figura 12).

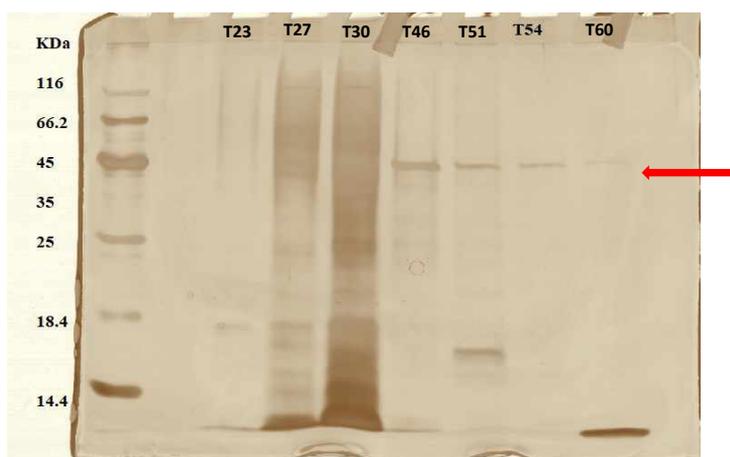


Figura 12: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%, após a purificação da rBpSP-II por HPLC-RP. O T54 corresponde a fração eluída com 82% da solução B. A seta em vermelho indica a proteína recombinante.

Observou-se que a rBpSP-II foi eluída no pico referente ao Tubo 54, sendo indicada pela seta vermelha na Figura 11, possuindo aproximadamente 45 KDa (ISABEL et al., 2016). O tempo de retenção da amostra foi de 1 hora e 48 minutos. Desse modo, quando a porcentagem da solução B atingiu 82% a mesma foi eluída, demonstrando que a serinoprotease recombinante é mais hidrofóbica.

4.3. Dosagem e recuperação proteica

Para verificar o rendimento após os dois passos cromatográficos foi feita dosagem por Bradford. A Tabela 1 apresenta a recuperação proteica da rBpSP-II após a realização de passos cromatográficos. Ao final das cromatografias realizadas obteve-se um rendimento de 0,10 % da rBpSP-II com relação ao meio de cultura.

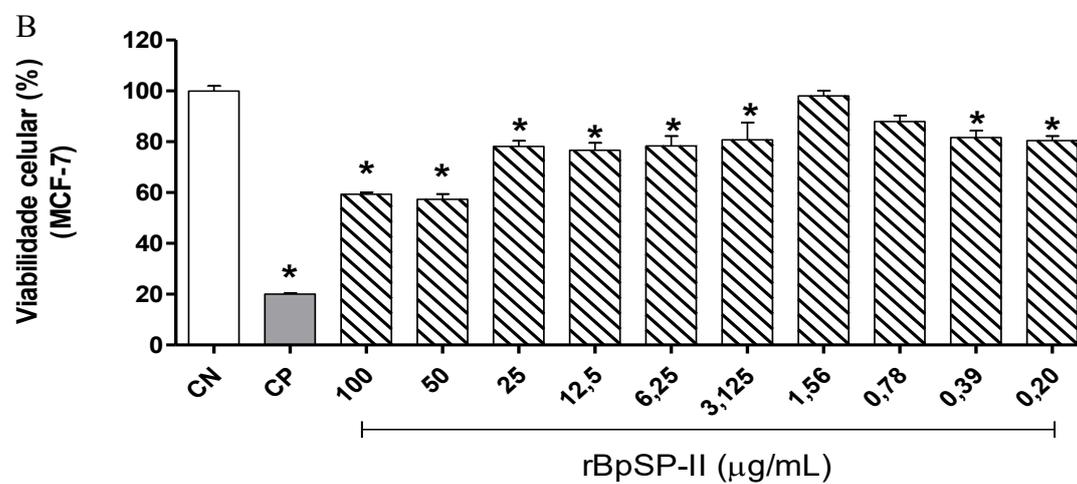
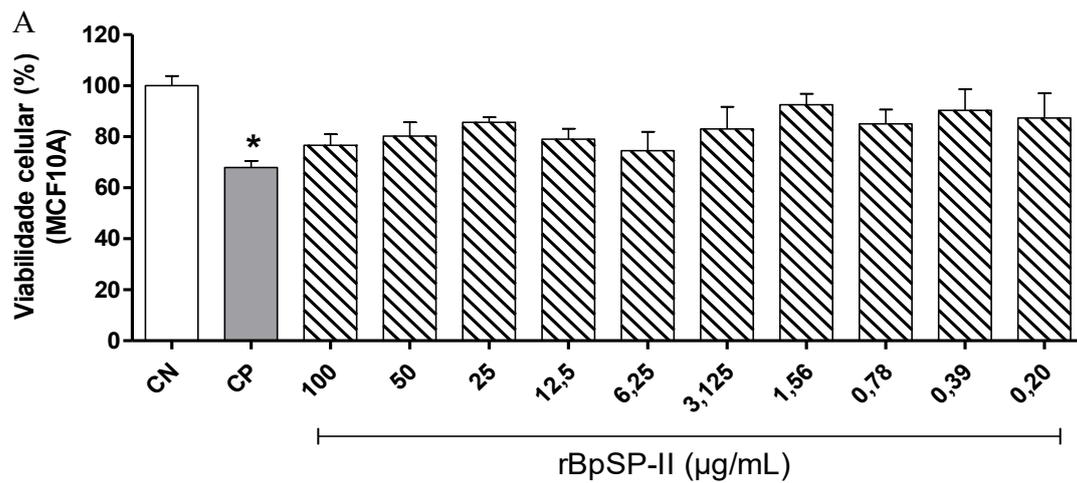
Tabela 1. Recuperação proteica dos passos cromatográficos da serinoprotease recombinante (rBpSP-II), a partir de 100 mL de meio de cultura. A recuperação foi expressa em mg/L e porcentagem (%).

	Proteína (mg/L)	Recuperação (%)
Meio de cultura	292,8	100
Purificação em Níquel	13	4,4
Purificação HPLC-RP	0,30	0,10

4.4. Ensaio de citotoxicidade

A fim de verificar uma possível atividade antitumoral foi realizado primeiramente um ensaio de citotoxicidade por MTT. Utilizou-se nesse teste duas linhagens tumorais imortalizadas: adenocarcinomas de mama (linhagem MCF-7) e carcinoma hepatocelular humano (linhagem HepG2). Para o controle foi utilizado células de mama não tumorigênica (MCF10A). Em todas as linhagens descritas foram realizados 3 experimentos independentes, em triplicata.

As células testes foram tratadas com diferentes concentrações da rBpSP-II (0,2 a 100µg/mL). O controle negativo recebeu PBS e o controle positivo cisplatina. Os resultados desse ensaio são mostrados na Figura 13.



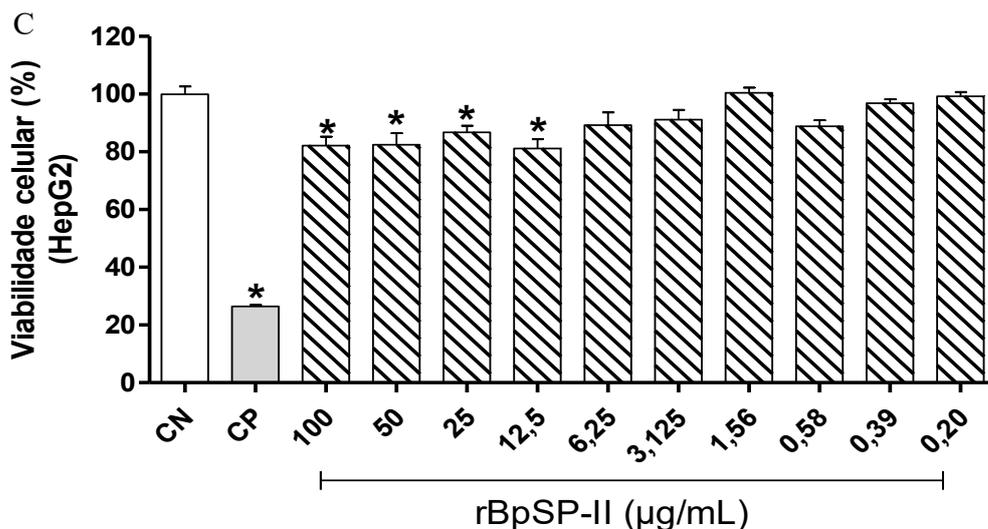


Figura 13. Análise de citotoxicidade da rBpSP-II em MCF10A (A), MCF-7 (B), HepG2 (C). As culturas de células foram tratadas com diferentes concentrações da serinoprotease (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39 ou 0,20 µg/mL) por 24h.

A rBpSP-II não foi citotóxica para as células MCF10A (célula normal de mama) em nenhuma das concentrações testadas (Figura 13A), porém ela demonstrou atividade citotóxica sobre as duas linhagens tumorais. A sua maior atividade citotóxica foi na linhagem MCF-7 (tumor de mama), matando aproximadamente 40% das células nas maiores concentrações testadas (Figura 13B), enquanto que na linhagem HepG2 (tumor de fígado) a rBpSP-II foi citotóxica para 20% das células (Figura 13C).

4.5. Apoptose/necrose por citometria de fluxo

Uma vez confirmado o potencial citotóxico da rBpSP-II em células tumorais, foi necessário investigar em qual via acontece o processo que leva a morte dessas linhagens. Assim, realizou-se um ensaio de apoptose/necrose a fim de analisar se a serinoprotease recombinante é capaz de induzir essas vias, diminuindo a exacerbação de células mutantes. Foi constatado que em todas as concentrações da rBpSP-II testadas (0,78; 6,25 e 50 µg/mL) houve indução apoptótica em células tumorais MCF-7 (Figura 14).

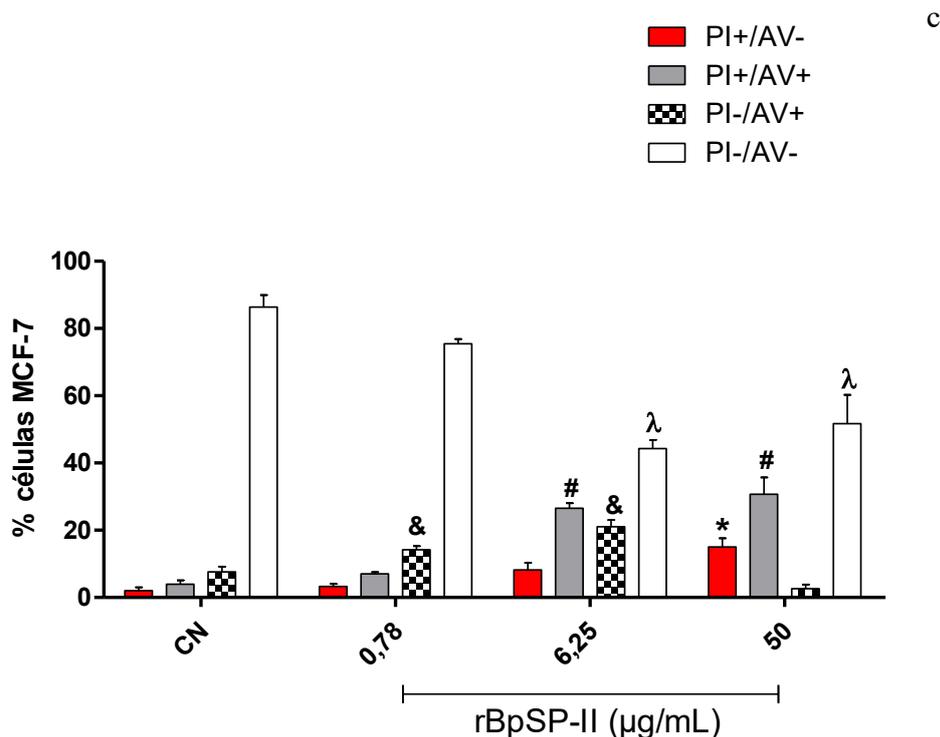


Figura 14: Avaliação do potencial apoptótico/necrótico da rBpSP-II em MCF-7 por citometria de fluxo. A população de células em necrose foi marcada com PI (PI+/AV-), em apoptose foi marcada com anexina FITC V (PI-/AV+) e população com células necróticas e apoptóticas foi marcada como PI+/AV+. As células vivas não foram marcadas (PI-/AV-). Resultados expressos pela média \pm SD para três experimentos independentes ($n = 3$). As diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) foram marcadas com * (valores de PI+/AV- em relação ao CN); # (valores de PI+/AV+ em relação ao CN); & (valores de PI-/AV+ em relação ao CN); λ (valores de PI-/AV- em relação ao CN) utilizando o teste one-way ANOVA e Tukey post-tests.

Observou-se no tratamento de $0,78\mu\text{g/mL}$, 15% das células estavam em processo de apoptose. A maior atividade da rBpSP-II foi no tratamento com $6,25\mu\text{g/mL}$, no qual aproximadamente 50% das células estavam em processo de apoptose, sendo 26,5 % em apoptose tardia (PI+/AV+) e 21% em processo de apoptose (PI-/AV+). Por fim, no tratamento de $50\mu\text{g/mL}$, 31% das células estavam em processo de apoptose tardia (PI+/AV+). Além disso, nessa concentração, houve um aumento significativo de células que estavam em processo necrótico. É possível verificar que com o aumento da concentração, primeiramente ocorre um aumento na porcentagem de células em apoptose (PI-/AV+), seguido por um aumento de células em apoptose tardia (PI+/AV+), porém em concentração maiores, há uma tendência de diminuição nos processos apoptóticos e um aumento em processos necróticos.

5. DISCUSSÃO

Uma das principais contribuições da biotecnologia moderna é o uso de sistemas de expressão heteróloga para produção de moléculas de interesse farmacológicos. Para a compreensão do funcionamento desse método é necessário primeiramente ter o conhecimento sobre o dogma central da biologia molecular. Esse dogma consiste em três processos essenciais para que a informação genética seja expressa: replicação, transcrição e tradução. Desse modo, uma mensagem genética presente no DNA de um sistema de expressão, mesmo derivada de outra espécie, pode ser decifrada e expressa em forma de proteína, graças as técnicas do DNA recombinante e otimização de códons (MIYAMOTO, 2013).

A utilização destas técnicas pode viabilizar a aplicação biotecnológica de toxinas, visto que a obtenção de algumas biomoléculas a partir das peçonhas ofídicas pode ser um fator limitante para os estudos na área toxinológica.

Algumas serinoproteases como a Batroxobina, isolada da peçonha de *Bothrops atrox* e Ancrod isolada de *Calloselasma rhodostoma*, as quais possuem potenciais terapêuticos, também foram produzidas por expressão heteróloga utilizando o sistema de expressão *Pichia pastoris* (LI et al., 2007; YU et al., 2007). Logo, o sistema de expressão *Pichia pastoris* é eficiente uma vez que é capaz de realizar e manter algumas características comuns da classe das serinoproteases, permitindo assim a conservação de sua atividade.

A expressão da rBpSP-II foi feita utilizando o sistema de expressão em *Pichia pastoris* e foi realizado em três etapas. As duas primeiras etapas possuem o objetivo de crescimento celular rápido e geração de biomassa, utilizando o glicerol como fonte de carbono. Essa geração da biomassa permite altas densidades celulares, as quais são diretamente proporcionais à concentração da proteína de interesse no meio de indução (TORRES & MORAES, 2000). A última etapa tem como finalidade a indução da expressão da proteína recombinante, para isso utiliza-se o metanol como indutor e fonte de carbono. O metanol é um indutor relativamente barato e que regula fortemente o promotor AOX1, já que ele é ativado na presença desse álcool, fazendo com que as células iniciem a expressão da proteína de interesse (TORRES & MORAES, 2000).

É possível perceber essa regulação nas análises feitas dos tempos da expressão da proteína rBpSP-II, por SDS-PAGE (Figura 8). A barra vermelha está indicando as bandas da expressão da serinoprotease recombinante. Isabel e colaboradores descreveram que esta proteína recombinante possui massa molecular de aproximadamente de 45 KDa (ISABEL et al., 2016),

confirmando a expressão da rBpSP-II. No tempo 0 horas, não há nenhuma banda que corresponda a 45 KDa já que a rBpSP-II não é expressa de forma natural pela *Pichia pastoris*. Esse resultado era de se esperar, uma vez que no tempo 0 horas, o indutor metanol ainda não fora colocado no meio, logo não houve ativação do promotor AOX1. No decorrer do tempo, e com a adição de metanol 100% a cada 24 horas, é possível a visualização da banda que corresponde a serinoprotease recombinante, indicando que o promotor AOX1 foi ativado, permitindo a transcrição do gene que codifica a proteína de interesse. A expressão foi realizada durante um período de 96 horas, sendo que o maior nível de expressão foi em 96 horas (Figura 8).

Uma vez comprovada a expressão, o sobrenadante do meio de indução foi submetido a cromatografia de afinidade utilizando a resina de níquel Ni-NTA Superflow, a fim de purificar a rBpSP-II. A resina de afinidade apresenta íons metálicos imobilizados (IMAC) explora a afinidade da interação entre resíduos doadores de elétrons presentes na superfície de biomoléculas e grupos metálicos quelatados em um suporte sólido. Os agentes quelantes são acoplados a matriz por ligações covalentes e quando um íon metálico é quelatado por ele, gera um centro de adsorção, em que esse metal apresentará sítios de ligação livres para a interação com a biomolécula (BRESOLIN, 2009). Essas moléculas adsorvidas podem ser eluídas por competição utilizando o imidazol.

No processo de clonagem da proteína recombinante foi colocado seis resíduos de histidina na porção C- terminal da proteína, com o objetivo de facilitar o processo de purificação. Nesse caso, o imidazol dessas histidinas doam seus elétrons para o íon metálico. Portanto, a afinidade dos resíduos de histidina por íons metálicos como o níquel, faz com que a proteína de interesse fique retida na coluna enquanto as demais moléculas são removidas.

Acreditava-se que pelo primeiro passo de purificação, a rBpSP-II já estava pura. Porém, na realização do gel SDS-PAGE após um processo de concentração e diálise, utilizando o Centricon, foi possível a visualização de outras bandas, as quais indicam a presença de contaminantes (Figura 10). Isso deve ter ocorrido, pois, as amostras das frações estavam diluídas e como o nível de expressão da rBpSP-II é maior que esses outros contaminantes, foi possível somente a visualização da serinoprotease, mesmo na coloração mais sensível (BASSAM et al. 1991). A partir daí, concluiu-se que além da interação da molécula de interesse, outras proteínas (contaminantes) interagiram com a resina, impossibilitando o processo de purificação em uma única etapa cromatográfica. Esse imprevisto não invalida os

resultados mostrados nesse trabalho uma vez que o nível de expressão da rBpSP-II é bem maior do que a dos outros contaminantes, logo a atividade antitumoral é graças a proteína recombinante. Além disso, é de se esperar que com a eliminação dos contaminantes por métodos que purifiquem a rBpSP-II, a sua atividade antitumoral será maior.

Com o objetivo de eliminar os contaminantes, a purificação por HPLC-RP foi adotada. As frações obtidas pela cromatografia de afinidade em resina de níquel Ni-NTA Superflow (2,5mg), foram fracionadas em sistema de HPLC em fase reversa (HPLC-RP) utilizando uma coluna C18 resultando em vários picos, confirmando a heterogeneidade da amostra (Figura 11). Todos os picos de eluição foram visualizados no gel a fim de descobrir em qual porcentagem de solução B a rBpSP-II foi eluída. Depois dessa análise, concluiu-se que a proteína recombinante pura foi eluída no pico presente no tubo 54 (T54) (Figura 12), o que corresponde a 82% de solução B.

Portanto a rBpSP-II foi purificada, para isso, foi utilizado dois passos cromatográficos. O primeiro corresponde a uma cromatografia de afinidade em resina de níquel Ni-NTA Superflow e o segundo passo foi a cromatografia de Fase Reversa (C18) em sistema HPLC.

Uma das vantagens da produção de moléculas de interesse de forma heteróloga no sistema de expressão *Pichia pastoris* é que há concentrações muito elevadas de biomassa, gerando a produção de grandes quantidades de proteínas recombinantes. Além disso, nesse tipo de expressão é usado um promotor forte e altamente regulado que auxilia também em maiores rendimentos proteicos (TORRES & MORAES, 2000). Porém ao analisar a tabela de rendimentos (Tabela 1), observa-se que pelos dois métodos de purificação, não houve um rendimento significativo e esperado. Ao final das duas cromatografias, obteve-se um rendimento de 0,10% da rBpSP-II, o que representa 0,30mg/L. Para minimizar esse problema e otimizar a produção de moléculas de interesse, pesquisas moleculares recentes têm se concentrado em inúmeras questões, incluindo o design de vetores de expressão, otimização do número de cópias de genes, co-expressão de proteínas secretoras como chaperonas, engenharia de glicosilação e vias secretoras etc (LOOSER et al., 2015).

Portanto, é necessário estudar novas estratégias de purificação e otimização do processo para que a expressão heteróloga da rBpSP-II produza maiores rendimentos.

O Brasil possui uma grande biodiversidade, desse modo, os potenciais biotecnológicos de alguns produtos naturais como fonte farmacológica são alvos de estudos e pesquisas. As

toxinas de serpentes contribuem de forma significativa para a síntese de moléculas para o tratamento de várias condições medicinais (VYAS et al., 2013).

A otimização e a busca de novas abordagens para o tratamento contra o câncer são alguns dos principais desafios que a pesquisa na área médica mundial tenta solucionar. Muitos peptídeos e proteínas derivados de peçonhas das serpentes demonstraram propriedades anti-angiogênicas e anti-metastáticas, afetando a migração e a proliferação de células tumorais o que comprova que estas toxinas se ligam de forma específicas às membranas das células cancerosas (EJAZ et al., 2018; VYAS et al., 2013; CALDERON et al., 2014).

A citotoxicidade da proteína recombinante sobre as linhagens tumorais (HepG2 e MCF-7) e células não tumorais (MCF10A) foi avaliado pelo ensaio de MTT. A rBpSP-II apresentou citotoxicidade significativa frente as células tumorais, ao passo que, a mesma não foi citotóxica para as células MCF10A em nenhuma das concentrações testadas. Os resultados mostraram uma preferência da proteína recombinante pelas células tumorais do que pelas células não tumorais (Figura 13), deixando claro o potencial antitumoral dessa toxina. Sabe-se que glicosilação de proteínas facilite a ancoragem de enzimas à superfície de células cancerosas, uma vez que as propriedades das membranas dessas células são diferentes, portando acredita-se que as glicosilações presentes na rBpSP-II pode explicar sua preferência por células tumorais. (TANG et al.; 2018)

As toxinas presentes nas peçonhas de serpentes são consideradas um grande potencial terapêutico antitumoral devido à sua alta toxicidade, causando a retardação do crescimento dessas células (VYAS et al., 2013; EJAZ et al., 2018). Além disso, elas possuem afinidade e ações específicas, tornando-as ferramentas biotecnológicas atrativas (CALDERON et al., 2014). Muitos estudos demonstram o potencial antitumoral da peçonha bruta e de toxinas isoladas, de diferentes espécies de serpentes, sobre linhagens tumorais (KERKKAMP et al., 2018; EJAZ et al., 2018).

A fim de investigar o mecanismo de morte que possa explicar o efeito citotóxico induzido pela rBpSP-II, avaliou-se seu efeito sobre a apoptose e necrose na linhagem em que a toxina foi mais citotóxica.

A apoptose é um processo de morte celular altamente regulado que ocorre de forma não acidental, por isso muitas vezes ela também é denominada de “morte celular programada”. Esse processo é importante em diversas situações fisiológicas, como na reposição de certos tecidos, e na eliminação de célula após algum dano celular (NIKOLETOPOULOU et al.;

2013). Entretanto algumas doenças, como neoplasia e doenças autoimunes, possuem uma resistência anormal a esse processo, levando a exacerbação de células mutantes (RAMENGGHI et al., 2000). Portanto, a indução da apoptose é um dos mecanismos mais importantes das drogas antitumorais, uma vez que esse processo é capaz tanto de reduzir o tamanho do tumor, quanto de diminuir o número de células cancerosas (VYAS et al., 2013; IGNEY; KRAMMER, 2002; SUN et al., 2003).

Para a avaliação da indução da apoptose/necrose foi feito uma citometria de fluxo de células após ligação com anexina V / FITC e PI (Figura 11). Todas as concentrações de rBpSP-II testadas (0,78; 6,25 e 50 µg/mL) induziram apoptose em células tumorais MCF-7 após o tratamento por 24 horas.

Portanto, observa-se que a rBpSP-II apresentou uma citotoxicidade maior em células tumorais do que em normais, além disso, a protease induziu eventos que levasse à apoptose da linhagem tumoral MCF-7.

Algumas serinoproteases endógenas interagem com mediadores do processo apoptótico, dessa forma, pesquisas apontam que essas proteases desencadeiam alguns eventos nucleares como condensação, fragmentação e degradação de DNA observado em apoptose de estágio tardio. Um exemplo é que altas concentrações de trombina, quando estão associadas com as capases, prejudica o crescimento de células tumorais por parada do ciclo celular (STENSON-COX; FITZGERALD; SAMALI, 2003). Esse efeito não é observado em células normais, enfatizando o potencial antitumoral das serinoproteases. Entretanto, não é possível afirmar que a rBpSP-II possui esse mesmo mecanismo de ação.

Já foi descrito na literatura algumas toxinas isoladas de *Bothrops pauloensis* que possuem efeitos citotóxicos, anti-angiogênicos e anti-metastáticos. Um exemplo é o efeito antitumoral e anti-angiogênico em células de câncer de mama MDA-MB-231 induzidas pela Bothropoidina, uma metaloprotease isolada da peçonha da *Bothrops pauloensis* (GUIMARÃES et al., 2017). Bothropoidina mostrou 30% de citotoxicidade na concentração de 100µg/mL depois de 24 horas de tratamento, porém no tratamento com uma linhagem não tumorigênica (MCF10A), demonstrou somente 10% de citotoxicidade. Outro exemplo são os efeitos antitumorais de uma BnSP-6, uma Fosfolipase A₂ de uma Lys 49 isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, em células MDA-MB-231 de câncer de mama humano. A BnSP-6 causou citotoxicidade dose dependente danificando aproximadamente 10 a 45% das células MDA-MB-231 nas concentrações de 12,5-100 µg/mL, inibiu a adesão celular, estimulou o

processo de autofagia, induziu a apoptose e causou um aumento notável na expressão gênica de BRCA2 e TP53, supressores tumorais (AZEVEDO et al., 2016). Essas toxinas, assim como a serinoprotease recombinante, apresentaram uma citotoxicidade maior quando foram tratadas em células tumorais, sugerindo que todas elas podem ter como alvo preferencial células cancerígenas.

A deposição de fibrina ao redor do tumor pode contribuir para a proteção do tumor e ajudar a disseminar as células tumorais, mas também pode prevenir a progressão tumoral. Algumas toxinas com características desfibrinogênicas, como a serinoprotease Ancrod, tendem a diminuir a progressão do tumor e diminuí-lo por fibrinólise (DEWYS; KWAAN; BATHINA, 1976).

Há vários estudos demonstrando que os pacientes vítimas de câncer possuem uma sobrevida prolongada quando recebem anticoagulantes (TIEKEN; VERSTEEG, 2016). Portanto, estratégias devem ser elaboradas para que esses anticoagulantes sejam eficientes para atacar o tumor, resolvendo também a coagulopatia.

Por fim, é importante ressaltar que é necessária a identificação de compostos com atividade antitumoral, mas também a elucidação do mecanismo de ação das toxinas que possuem essa atividade (CALDERON et al., 2014). Sabe-se que a citotoxicidade das toxinas derivadas de peçonhas das serpentes está relacionada às alterações no metabolismo celular, com efeito mais significativo nas células tumorais em comparação com células normais. Os mecanismos de ação dessas alterações incluem: aumento do influxo de Ca^{+} , indução da liberação do citocromo C; aumento ou diminuição da expressão de proteínas que controlam o ciclo celular; inibição da síntese de ácidos nucleicos; alteração na membrana celular; inibição da metastatização induzida pela trombina; indução da apoptose de células cancerosas; geração de radicais livres, entre outros (VYAS et al., 2013; CALDERON et al., 2014).

6. CONCLUSÃO

Os ensaios para a produção da serinoprotease recombinante de *B. pauloensis* (rBpSP-II) mostraram que apesar do baixo rendimento após os dois passos cromatográficos, foi possível testar sua ação antitumoral sobre algumas linhagens celulares. Dessa forma, este trabalho abre perspectivas para novos estudos com finalidade de elucidar o mecanismo de ação destas proteases frente às células tumorais.

7. REFERÊNCIAS

ACHÊ, D. C. et al. Biochemical properties of a new PI SVMP from *Bothrops pauloensis*: inhibition of cell adhesion and angiogenesis. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 445-53, 4 jan. 2015.

AOKI, H; NAZMUL AHSAN, M.; WATABE, S. Heterologous expression in *Pichia pastoris* and single-step purification of a cysteine proteinase from northern shrimp. **Protein Expr Purif**, v. 31, n. 2, p. 213-221, 2003.

AZEVEDO, F. V. P. V. et al. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, ad Lys-49 PLA₂ homologue from *Bothrops pauloensis* venom. *International journal of biological macromolecules*, v. 82, p. 671-7, 5 jan. 2016.

BATISTA DRP, MATTOS M DE, SILVA SF. Convivendo com o câncer: do diagnóstico ao tratamento. **Rev Enferm UFSM**, 2015.

BARRET, A. J.; RAWLINGS, N. D. Families and clans of serine peptidases. **Arch Biochem. Biophys.** v. 318. p. 247-250. 1995.

BARROS, L. C.; SOARES, A. M.; COSTA, F. L.; RODRIGUES, V. M.; FULY, A. L.; GIGLIO, J. R.; GALLACCI, M.; THOMAZINI-SANTOS, I. A.; BARRAVIERA, S. R. C. S.; BARRAVIERA, B.; FERREIRA JUNIOR, R. S. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine, v. 17, n. 1, p. 23-33, 2009.

BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLÉS, G; GRESSHOFF, P. M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamid gels. **Analytical biochemistry**, v. 196, p. 80-83, 1991.

BÉRNILS. Brazilian reptiles: List of species. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Version 2015.1. 2015

BRESOLIN, E.; MIRANDA, S. B. Immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) of biomolecules: fundamental aspects and technological applications. **Química nova**, v. 32, p. 1288-1298, 2009.

BUCHAIM, R. L. et al. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on peripheral nerve regeneration using fibrin glue derived from snake venom. **Injury**, v. 46, n. 4, p. 655-60, 3 abr. 2015.

BURIN, S. M. et al. An overview of the immune modulating effects of enzymatic toxins from snake venoms. **International journal of biological macromolecules**, v. 109, p. 664-671, abr. 2018.

CALDERON, L. A. et al. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. *BioMed research international*, v. 2014, p. 203639, 3 jan. 2014.

CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v. 583, p. 1736-1743, 2009.

CARDOSO, J. L. C. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo-SP: Sarvier, 2003. 468 p.

CARDOSO, C.C. et. al. Análise etnoherpetológica acerca das serpentes: influência no ensino de Biologia. In: XI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PUCRS, XI, 2010. Salão de iniciação científica. PUCRS. 2010. p. 148-150.

CASTRO, H. C. RODRIGUES, C. R. Current status of snake venom thrombin-like enzymes. **Toxin**. Rev. 25, 291–318, 2006.

CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; ALBUQUERQUE, M. G.; PUJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C. R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptiliase to now. **Cell. Mol. Life Sci**, v. 61, p. 843-856, 2004.

CEREGHINO, G. P. et al. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 329-32, 4 ago. 2002.

CEREGHINO, J.L.; CREGG, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Elsevier FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.

DAVIE, E.W. A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278 (51), p. 50819-50832, 2003.

DE OLIVEIRA, A. L. et al. Avaliação epidemiológica e laboratorial de pacientes que sofreram acidente ofídico na cidade de Miracatu (Vale do Ribeira, São Paulo). *Revista de Patologia Tropical*, v. 37, n. 3, p. 268-274, 2008.

DEWYS, W. D.; KWAAN, H. C.; BATHINA, S. Effect of defibrination on tumor growth and response to chemotherapy. **Cancer research**, v. 36, n. 10, p. 3584-7, 5 out. 1976.

DI CERA, E.; DANG, Q. D.; AYALA, Y. M. Molecular mechanisms of thrombin function. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 53, n. 9, p. 701-30, 1 set. 1997.

DINIZ, M.; FERREIRA, L. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. *Estudos Avançados*, v. 24, n. 70, p. 19-30. 2010.

DUARTE M.; A. LONGATTO FILHO.; F. C. SCMITT. Angiogenesis, haemostasis and cancer: new paradigms and old concerns. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, vol. 43, pp. 441–449, 2007.

EJAZ, S. et al. Applications of Venom Proteins as Potential Anticancer agents. *Protein and peptide letters*, 3 jun. 2018.

FALANGA, A.; MARCHETTI, M.; VIGNOLI, A. Coagulation and cancer: biological and clinical aspects. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, v. 11, n. 2, p. 223-33, 5 fev. 2013.

FERREIRA CN, SOUSA M, DUSSE L, CARVALHO M. A cell-based model of coagulation and its implications. **Rev Bras Hematol Hemoter**. 2010;32(5):416-421.

FUNK, C.; GMUR, J.; HEROLD, R.; STRAUB, P. W. Reptilase®-R-a new reagent in blood coagulation. **Br. J. Haematol**. p. 43-54, 1971.

GADERNAL, ISABEL. Pesquisas desvendam funções de proteínas presentes em venenos de cobras. **Jornal da Unicamp**, Campinas, v. 457, n.24, p.00-021, 2010.

GUERREIRO, J. R. Análise Proteômica de *Bothrops atrox* durante seu desenvolvimento ontogenético. Dissertação – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2009.

GUIMARÃES, D. DE O. et al. In vitro antitumor and antiangiogenic effects of Bothropoidin, a metalloproteinase from *Bothrops pauloensis* snake venom. *International journal of biological macromolecules*, v. 97, p. 770-777, 6 abr. 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, 5 mar. 2011.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501-24, dez. 2002.

HOFFMAN M. Remodeling the blood coagulation cascade. **J Thromb Thrombolysis**, 2003.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. **Journal of leukocyte biology**, v. 71, n. 6, p. 907-20, 6 jun. 2002.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER) - O que é câncer? Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer> >. Acesso em 10 de novembro de 2018.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER) – Tratamento do câncer- Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>>. Acesso em 10 de novembro de 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2018. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Atlas da Mortalidade. Disponível em: <<http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>>. Acesso em: 30/08/2018.

ISABEL, T. F. et al. Expression and partial biochemical characterization of a recombinant serine protease from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**: official journal of the International Society on Toxinology, v. 115, p. 49-54, 3 jun. 2016.

JEREMY, M.B., JOHN. L.T.,& S. LUBERT. **Biochemistry**: 5 ed. New York: W H Freeman. 2002.

KANG, T.S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M.T.; SINHA, M.; KUMAR, R. P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S. Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS J**, v. 278, p. 4544–4576, 2011.

KERKKAMP, H. et al. Whole snake venoms: Cytotoxic, anti-metastatic and antiangiogenic properties. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 150, p. 39-49, 3 ago. 2018.

KINI, R.M. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. **Toxicon**, v. 45, p. 1133–1145, 2005.

KINI, R.M. Serine Proteases Affecting Blood Coagulation and Fibrinolysis from Snake Venoms. **PathophysiolHaemostThromb**, v. 34, p. 200–204, 2006.

KOCHVA, E. The origino f snakes and evolutionary of the venom apparatus. **Toxicon**. v.25, n.1, p.65-106, 1986.

KRAINER, F. W. et al. Biotechnological advances towards an enhanced peroxidase production in *Pichia pastoris*. **Journal of biotechnology**, v. 233, p. 181-9, 6 set. 2016.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, M. S. Y.; SCANLON J. D. Snake phylogeny based on osteology, soft anatomy and ecology. **Biol. Rev.** v. 77, p. 333-401, 2002.

- LIMA, L. G.; MONTEIRO, R. Q. Activation of blood coagulation in cancer, 2013.
- LI, Z.-F. F. et al. [Recombinant batroxobin expressed highly in *Pichia pastoris*]. **Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 483-6, 2 maio 2007.
- LOOSER, V. et al. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6 Pt 2, p. 1177-93, nov. 2015.
- MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v.36, p.1749-1800, 1998.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 146-156, 2000.
- MESQUITA, D.O. Biometria, folidose e ecologia da população de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril, 1854 (Serpentes Crotalinae) da zona geográfica do Triângulo e Alto Paranaíba-MG. Monografia. Universidade Federal de Uberlândia. p.49, 1997.
- MINISTERIO DA SAÚDE- Acidentes por animais peçonhentos – Serpentes. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos-serpentes>>.
Acesso em 10 de novembro de 2018.
- MINISTERIO DA SAÚDE. Casos de acidentes por serpentes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2013*. 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/10/Tabela-06---CASOS---serpente---2000-a-2013---21-05-2014.pdf>>. Acesso em: 18 novembro 2018.
- MIYAMOTO, C. A. Produção de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*. **Revista conexão eletrônica**, p. 220–233, 2013.
- MOURA, M.R. et al. O relacionamento entre pessoas e serpentes no leste de Minas Gerais, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica* 10(4): 133-142, 2010
- NAUMANN, G. B.; SIVA, L.; FARIA, G.; RICHARDSON, M.; EVANGELISTA, K.; Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by na L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biophys Acta**. p. 683-694, 2011.
- NIKOLETOPOULOOU, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1833, 3448-3459, 2013.
- NORRIS, L. A. Blood coagulation. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 17, n. 3, p. 369-83, jun. 2003.

- NÚÑEZ, V.; CID, P.; SANZ, L.; TORRE, P. D. L.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. **Journal of proteomics**, v. 73, p. 57-58, 2009.
- PAGE, M. J. & DI CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cell. Mol. Life Sci.** 65, p. 1220–1236, 2008.
- PARRY, M. A., JACOB, U., HUBER, R., WISNER, A., BON, C., BODE, W. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. **Structure** 6, 1195–1206, 1998.
- POLACK, B. [Thrombin: a multifunctional enzyme]. **Annales de biologie clinique**, v. 61, n. 1, p. 23-31, 3 jan. 2003.
- RAMENGI, U.; BONISSONI, S.; MIGLIARETTI, G.; DEFRENCO, S.; BOTTAREL, F.; GAMBARUTO, C. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. **Blood.**, Washinton, v.95, n.10, p.3176-82, 2000.
- RODRIGUES, R.S. Análise do perfil de expressão gênica da glândula de peçonha de *Bothrops pauloensis*. 2010. 157 f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, 2010.
- RODRIGUES, R.S.; BOLDRINI-FRANCA, J.; FONSECA, F.; DE LA TORRE, P.; HENRIQUE-SILVA, F.; SANZ, L.; CALVETE, J. C.; RODRIGUES, V. M. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 2707-2720, 2012.
- SAMY, R. P.; SETHI, G.; LIM, L. H. A brief update on potential molecular mechanisms underlying antimicrobial and wound-healing potency of snake venom molecules. **Biochemical pharmacology**, v. 115, p. 1-9, 4 set. 2016.
- SANTANA VTP.; SUCHARA EA. Epidemiologia dos Acidentes com Animais Peçonhentos Registrados em Nova Xavantina - MT. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*. v.5, n3, p.141-46, 2015.
- SANTOS-FITA, D.; COSTA-NETO, E.M. As interações entre os seres humanos e os animais: a contribuição da etnozologia. **Biotemas** 20(4): 99-110, 2007.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v.57, p.627–645, 2011.

SPOTNITZ, W. D. Fibrin selant: th only appoved hemostat, sealant and adhesive: a laboratory and clinical perspective. **ISRN Surgery**, 2014.

SBH 2018. Herpetologia Brasileira. Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). Volume 7 – Número 1 – Fevereiro de 2018.

SERRANO, S. M.T. The long road of reseach on snake serine proteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 19-26, 2013.

SERRANO, S. M.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 8, p. 1115-32, 3 jun. 2005.

SILVA, Diana Pontes da. Análise comparativa da composição proteica e dos efeitos hemolítico, oxidante, antioxidante e coagulante das peçonhas brutas de machos e fêmeas da serpente *Bothrops leucurus*. 2017. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

SILVA, M.L.V.; ALVES A.G.C.; ALMEIDA, A.V.A zooterapia no Recife (Pernambuco): uma articulação entre as práticas e a história. **Biotemas** 17(1): 95-116, 2004.

STADLMAYR, G. et al. Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production. **Journal of biotechnology**, v. 150, n. 4, p. 519-29, 3 dez. 2010.

STENSON-COX, C.; FITZGERALD, U.; SAMALI, A. In the cut and thrust of apoptosis, serine proteases come of age. **Biochemical pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1469-74, 3 out. 2003.

SUN, L.-K. K. et al. Apoptotic effect in the glioma cells induced by specific protein extracted from Okinawa Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom in relation to oxidative stress. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 17, n. 2, p. 169-77, 2 abr. 2003.

SUNAGAR, K.; UNDHEIM, E. A. B.; SCHEIB, H.; GREN, E. C. K.; COCHRAN, C.; PERSON, C. E.; KOLUDAROV, I.; KELLIN, W.; HAYES, W. K.; KING, G. F.; ANTUNES, A.; FRY, B. G. Intraspecific venom variation in the medically significant southern

pacific rattlesnake (*Crotalus oreganus helleri*): biodiscovery, clinical and evolutionary implications. **Journal of proteomics**, v.99, p. 68-83, 2014.

TAN, K. K.; BAY, B. H.; GOPALAKRISHNAKONE, P. L-amino acid oxidase from snake venom and its anticancer potential. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 144, p. 7-13, 4 mar. 2018.

TANS, G.; ROSING, J. Snake venom activators of factor X: an overview. **Haemostasis**, v. 31, n. 3-6, p. 225-33, 1 jan. 2001.

TIEKEN, C.; VERSTEEG, H. H. Anticoagulants versus cancer. **Thrombosis research**, v. 140 Suppl 1, p. S148-53, 5 abr. 2016.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras - Considerações sobre o uso de leveduras para a expressão de proteínas de interesse econômico. **Biociência**, v. 12, p. 20-22. 2000.

UETZ, P. & HOSEK, J. 2018. The Reptile Database. Acessado em 08 de novembro de 2018. www.reptile-database.org.

UNILUS Ensino e Pesquisa - Aplicação terapêutica das toxinas de ofídicos peçonhentos encontrados em território brasileiro. Disponível em: <<http://revista.unilus.edu.br/index.php/ruep/article/view/592/u2016v13n30e592>>. Acesso em 02 de novembro de 2018.

VALLE, L.A.; & BRITES, V.L. Nomes populares e aspectos ecológicos de *Bothrops pauloensis* em áreas antropizadas do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zootecias**, v.10 (2), p. 155-161, 2008.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M.J.S.M. Bioquímica de venenos de serpentes. In: Barraviera, B. editor. **Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. 1ª ed. Rio de Janeiro: EPUB; p. 205-23, 1999.

VYAS, V. K. et al. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 2, p. 156-62, 5 fev. 2013.

WANG, D. S.; HANAMOTO, M.; FANG, F.; OHBA, M.; ISHII, M., KIMURA F.; HIGAKI, E.; SENGA, H. Desfibrinogenating effect of batroxobin (Defibrase®) in rats and inhibition of migration of human vascular smooth muscle cells by the plasma of batroxobin-treated rats *in vivo*. **Atherosclerosis**. p. 73-80 2001.

WRAY, K. P. MARGRES, M. J.; SEAVY, M.; ROKYTA, D. R. Early significant ontogenetic changes in snake venoms. **Toxicon** 96. P-74-81, 2015.

YOU, W.-K. K. et al. Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. **FEBS letters**, v. 571, n. 1-3, p. 67-73, 5 jul. 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, 1 out. 2007.