

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Clonagem e expressão da enzima Bhalternina da peçonha de serpente *Bothrops alternatus* em sistema bacteriano

Rhaysa Mateus Tiago

Uberlândia - MG
Fevereiro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Clonagem e expressão da enzima Bhalternina da peçonha de serpente *Bothrops alternatus* em sistema bacteriano

Rhaysa Mateus Tiago

Jonny Yokosawa

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

Uberlândia - MG
Fevereiro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Clonagem e expressão da enzima Bhalternina da peçonha de serpente *Bothrops alternatus* em sistema bacteriano

Rhaysa Mateus Tiago

Jonny Yokosawa
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso de

Biotechnology em ____/____/____

Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG
Fevereiro – 2019

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Drº. Jonny Yokosawa pela paciência e os valiosos ensinamentos que vou levar para toda a vida.

Aos meus pais que sempre priorizaram meus estudos e me incentivaram a seguir meu caminho acadêmico.

Aos colegas de laboratório e professores da graduação que fizeram parte dessa jornada e contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

RESUMO

As serinoproteases são enzimas da peçonha capazes de esgotar o fibrinogênio circulante na presa por meio da quebra dessa molécula. A fibrina formada a partir dessa quebra é frágil e não promove a agregação plaquetária, tornando o sangue do indivíduo incoagulável. Há alguns anos foi descrita uma serinoprotease isolada a partir de peçonha de serpente da espécie *Bothrops alternatus*, denominada de Bhalternina, que apresentou atividade fibrinogenolítica. Enzimas que apresentam esse tipo de atividade, funcionam como agentes anticoagulantes e, por isso, possuem o potencial de serem aplicadas na terapia e prevenção de desordens trombóticas. Sendo assim, através da engenharia genética, o objetivo do trabalho foi realizar clonagem e expressão da enzima Bhalternina da peçonha de serpente *Bothrops alternatus* em sistema bacteriano. A sequência codificante desta proteína foi ligada ao vetor pGS-21a, e a reação de ligação foi utilizada na transformação de células competentes TOP10 por eletroporação. Após o cultivo, algumas colônias foram selecionadas para obtenção do DNA plasmidial e análise do perfil eletroforético. A colônia selecionada teve o DNA plasmidial purificado, que foi utilizado para confirmação da sequência codificante da Bhalternina e na transformação da bactéria *Escherichia coli* cepa BL21 *codon plus* (DE3) RIPL por eletroporação. Algumas colônias foram selecionadas e submetidas ao experimento de expressão da Bhalternina por indução com IPTG e a análise de sua expressão foi avaliada por eletroforese. Os resultados mostraram que uma proteína de massa molecular de 56,4 kDa, valor estimado da massa molecular da Bhalternina fundida à glutational S-transferase, foi expressa pelos clones.

Palavras-chave: Peçonha, Bhalternina, Expressão em bactérias, Proteína recombinante, Desordens trombóticas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Hemostasia, coagulação sanguínea e fibrinólise	1
1.2 Peçonha e proteases ofídicas	2
1.3 Serinoproteases	4
1.4 Bhalternina	5
1.5 Doenças vasculares	5
1.6 Proteínas recombinantes e expressão procariótica	7
1.7 Justificativa	8
2. OBJETIVOS	9
2.2 Objetivo Geral	9
2.3 Objetivos Específicos	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Obtenção do segmento que codifica a Bhalternina	10
3.2 Obtenção do vetor de expressão pGS21a	11
3.3 Construção do plasmídeo com a sequência codificante da Bhalternina	11
3.4 Transformação de células de <i>E.coli</i> competentes por eletroporação	12
3.5 Análise do DNA plasmidial	12
3.6 Obtenção do clone bacteriano para expressão da Bhalternina	13
3.7 Triagem de expressão dos clones	13
3.8 Expressão da Bhalternina	14
3.9 Lise Celular	14
3.10 Eletroforese de proteínas	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5 CONCLUSÕES	24
REFERÊNCIAS	25

LISTA DE FIGURAS

1. Perfil proteômico da peçonha de <i>Bothrops alternatus</i>	3
2. Esquema do mapa físico do DNA pPICBH1.....	10
3. Esquema do mapa físico do vetor pGS21a.....	11
4. Eletroforese em gel de agarose das amostras de DNA de pPICBH1 e pGS21a.....	15
5. Eletroforese em gel de agarose da reação de ligação do vetor com o fragmento de interesse.....	16
6. Colônias de bactérias TOP 10 transformadas cultivadas em placas de meio LB com Ampicilina.....	17
7. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com colônias de TOP 10 transformadas.....	18
8. Análise do início do segmento de Bhalternina sequenciado.....	18
9. Mapa virtual do plasmídeo construído pGSBH2.....	20
10. Colônias de bactérias BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL transformadas cultivadas em placas de meio LB.....	21
11. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com colônias de BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL transformadas.....	21
12. Eletroforese em gel de poliacrilamida das culturas de triagem de expressão.....	22
13. Eletroforese em gel de poliacrilamida das culturas que apresentaram maiores níveis de expressão.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS

1. μL – microlitros
2. SDS-PAGE – dodecil sulfato de sódio de poliacrilamida
3. PCR – reação em cadeia da polimerase
4. g – gramas
5. ml – mililitros
6. pb – pares de base
7. kDA – quilodalton
8. AVC – acidente vascular cerebral
9. DNA - ácido desoxirribonucleico
10. RNA - ácido ribonucleico
11. tRNA - ácido ribonucleico transportador

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hemostasia, coagulação sanguínea e fibrinólise

Hemostasia é o conjunto de mecanismos que mantêm o sangue fluido dentro do vaso, sem formar trombos nem extravasar (hemorragia). A hemostasia divide-se em 3 etapas: hemostasia primária, coagulação e fibrinólise. Em síntese, a hemostasia possui dois mecanismos opostos responsáveis pela formação e dissolução do coágulo de fibrina, o que mantêm em equilíbrio as propriedades hemodinâmicas do sangue (BRAUD, 2000).

Após uma lesão no vaso sanguíneo ocorre primeiramente a contração da musculatura lisa que envolve esse vaso lesionado. Em seguida ocorre a formação do tampão plaquetário, no qual plaquetas circulantes começam a se agregar ao sítio da lesão (adesão plaquetária) e novas plaquetas se aderem as plaquetas já aderidas no local da lesão (COTRAN *et al.*, 2000).

A formação do coágulo consiste na conversão do fibrinogênio em fibrina, por ação de uma enzima denominada trombina, visto que essa fibrina pode ser concebida por duas vias, a intrínseca e a extrínseca. O mecanismo intrínseco descreve a sequência de reações enzimáticas que ocorre quando o sangue entra em contato com a superfície lesada. O mecanismo extrínseco descreve a sequência de reações que após lesão de um vaso sanguíneo resultam na liberação de extratos teciduais. Estas duas vias convergem para a ativação do fator X na via comum, resultando na formação de fibrina (SWENSON, 1996; BANKS, 1991).

A via comum da coagulação inicia com ativação do fator X, através da combinação de fatores extrínsecos (fator III, cálcio, fator VII e fosfolipídios teciduais), assim como de fatores intrínsecos (FP3, fator IX e o fator VII). O fator X ativado combina-se com os fosfolipídios teciduais ou com fosfolipídios liberados pelas plaquetas, bem como fator V formando o ativador de protrombina (GUYTON & HALL, 2002).

O ativador de protrombina converte o fator II (protrombina) em fator IIa (trombina), a qual é responsável pela conversão do fibrinogênio (fator I) em fibrina. Essa fibrina solúvel é transformada em polímeros de fibrina insolúvel pelo fator XIII na presença de cálcio. O fator XIII circula no plasma sob a forma de proenzima inativa e é convertido em sua forma ativa pela trombina (BANKS, 1991).

A fibrinólise, contribui para que não ocorra a formação desordenada de trombos intravasculares, evitando complicações tromboembolíticas. O sistema fibrinogenolítico é composto por diversas proteases séricas e inibidores, que regulam a conversão de plasminogênio em plasmina, que além de degradar a fibrina, também ativa metaloproteases da matriz extracelular (COLLEN, 1999).

1.2 Peçonha e proteases ofídicas

Peçonhas compreendem misturas complexas de proteínas e peptídeos, sendo que uma das principais atividades é a enzimática decorrente de serinoproteases e metaloproteases (MARKLAND,1998). Essas enzimas geralmente afetam processos hemostáticos (GARCIA *et al.*, 2004), podendo ser classificadas como procoagulantes, anticoagulantes e/ou fibrinogenolíticas (MARKLAND JR, 1991).

Em peçonhas botrópicas é possível identificar grandes quantidades de componentes proteicos enzimáticos, no qual há uma predominância de metaloproteases, seguidas por serinoproteases, fosfolipases A₂, peptídeos potenciadores de bradicinina, peptídeos natriuréticos do tipo C e lectinas do tipo C (Figura 1) (CARDOSO *et al.*, 2010).

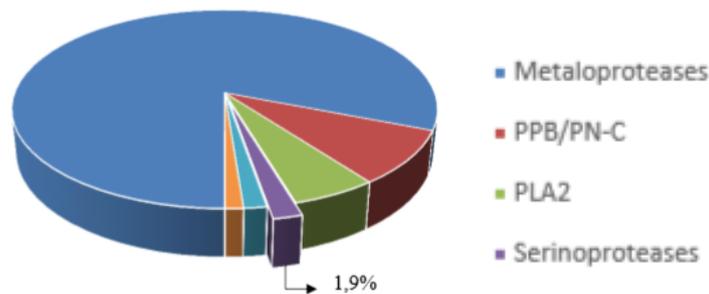


Figura 1: Perfil proteômico da peçonha de *Bothrops alternatus*. Abreviações: PPB: peptídeos potenciadores de bradicinina; PN-C: peptídeos natriuréticos do tipo C; PLA2: fosfolipase A₂. Fonte: adaptado de CARDOSO, 2010.

As fosfolipases A₂ produzidas por serpentes (SVPLA₂s) possuem em média 119 a 143 resíduos de aminoácidos e pertencem aos grupos I e II. Essas enzimas do grupo I são secretadas como zimogênios e apresentam atividade após clivagem proteica, enquanto as enzimas do grupo II formam uma ponte dissulfeto extra com um resíduo próximo ao sítio ativo (SETUBAL et al., 2013). As SVPLA₂s botrópicas metabolizam lipídeos estruturais da membrana celular (KINI, 2003) e induzem respostas inflamatórias (TEIXEIRA et al., 2003).

As metaloproteases encontradas em peçonhas ofídicas (SVMPs) são dependentes de cátions como Zn⁺², Ca⁺² ou Mg⁺², elas são sintetizadas na glândula de peçonha como proteínas multidomínios, sendo que estes domínios correspondem a um domínio proenzima e um domínio protease (RAMOS et al, 2003). As serinoproteases de peçonhas de serpentes (SVSPs) possuem resíduos de aminoácidos em posições específicas correspondendo à uma tríade catalítica altamente conservada, Ser₁₉₅, His₅₇ e Asp₁₀₂ (SERRANO, MAROUN, 2005).

As metaloproteases e serinoproteases possuem diferentes mecanismos de ação, no entanto desempenham a mesma função na natureza (SWENSON; MARKLAND, 2005). Essas enzimas são proteases, responsáveis pela catálise da clivagem das ligações peptídicas em proteínas. Esse tipo de enzima possui uma característica importante, na qual algumas delas clivam ligações peptídicas adjacentes à resíduos de aminoácidos específicos (NELSON, 2013).

1.3 Serinoproteases

As serinoproteases possuem configuração tridimensional semelhante à enzima digestiva, quimotripsina, que apresenta dois domínios assimétricos de folhas beta, separados pela tríade catalítica (LESK, FORDHAM, 1996). Essas enzimas estão presentes em organismos eucariontes e procariototes, sendo que nos seres humanos, as serinoproteases estão relacionadas a funções fisiológicas como a digestão, resposta imune, coagulação sanguínea e reprodução (TYNDALL, 2005).

As SVSPs são bastante específicas para substratos macromoleculares, apesar de sua especificidade de substrato primária ser semelhante à da tripsina, a especificidade macromolecular do substrato das SVSPs contrasta com a baixa atividade específica da tripsina. (SERRANO, 2013).

Segundo ensaios desempenhados por Magalhães *et al.* (2007) as SVSPs destacam-se pelo seu alto potencial fibrinogenolítico, são enzimas semelhantes a trombina (TLE: thrombin-like enzymes), enzima existente no sistema circulatório humano, sendo capazes de esgotar o fibrinogênio circulante por meio da quebra ou degradação dessa molécula. A fibrina formada a partir dessa quebra é frágil e não promove a agregação plaquetária, tornando o sangue do indivíduo incoagulável.

A atividade de serinoproteases está relacionada principalmente à ação do tipo TLE de peçonhas botrópicas (MATSUI *et al.*, 2000). Estas enzimas causam, paradoxalmente, coagulação sanguínea *in vitro* e incoagulabilidade *in vivo*, além disso ao contrário da ação da trombina, as enzimas TLEs não são inibidas pela heparina e, geralmente, não ativam o fator XIII da cascata de coagulação (MARKLAND, 1998; MAGALHÃES, 2007).

1.4 Bhalternina

De acordo com estudos de Costa *et al.* (2010) foi descrita uma serinoprotease isolada a partir de peçonha de serpente da espécie *B. alternatus* e chamada de Bhalternina, através da purificação dessa proteína obteve-se o sequenciamento dos aminoácidos dessa enzima purificada e sua análise indicou uma estrutura semelhante a serinoprotease de outras peçonhas.

A partir da administração dessa proteína em ratos foi observado que não houve coagulação do sangue, portanto, essa proteína induz a desfibrinogenação *in vivo*. Porém, a administração *in vitro* fez com que o sangue coagulasse e, portanto, essa enzima foi considerada *thrombin-like* apresentando atividades fibrinogénolíticas, albuminólíticas e desfibrinogénicas (COSTA *et al.*, 2010).

A pesquisa de Costa *et al.* (2010) demonstrou que a Bhalternina é capaz de hidrolisar a cadeia alfa do fibrinogênio, portanto, além de ser considerada uma TLE essa enzima também foi classificada como uma alfa-fibrinogénase. Essas características apresentadas por enzimas fibrinogénolíticas mostram ser eficientes anticoagulantes, assim, podem ter atividades terapêuticas antitrombóticas.

1.5 Doenças vasculares

Qualquer modificação que ocorra durante o trajeto do sangue pelo corpo humano, seja por doença ou lesões, promove o mau funcionamento dos vasos, podendo ocasionar o aparecimento de doenças vasculares. A trombose consiste em uma patologia do sistema circulatório, sendo decorrente da coagulação do sangue no interior das veias formando trombos e suas conseqüentes inflamações (SBACRJ, 2009).

Os trombos formados podem acometer as veias superficiais ou as veias mais profundas, ocasionando a trombose venosa profunda, a qual é mais grave, e requer tratamento intenso. Esses trombos podem se desprender das paredes das veias e serem direcionados pela corrente sanguínea até se alojarem nos vasos do pulmão, causando a embolia pulmonar, sendo capaz de levar o indivíduo à óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

As doenças cardiovasculares (DCVs) correspondem a um grupo de doenças relacionadas às desordens do coração e vasos sanguíneos e incluem doenças cardíacas coronárias, doenças cerebrovasculares, hipertensão, doenças arteriais periféricas e cardíacas reumáticas, anomalias cardíacas congênitas e falência cardíaca (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2017).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, estima-se que 17,7 milhões de pessoas morreram de DCVs em 2015, o que representa 31% das mortes globais. No Brasil, anualmente a média de mortes por essa doença chega a 350 mil. Entre as ocorrências mais comuns estão o Acidente Vascular cerebral (AVC) com 100 mil casos, o infarto com 85,9 mil casos e doenças relacionadas à hipertensão chegam a 46,8 mil casos, sendo que 27,3 mil são de insuficiência cardíaca.

Na busca por agentes terapêuticos para esse tipo de doença, as peçonhas fornecem muitas ferramentas úteis para decifrar vários processos fisiológicos envolvidos (KINI et al., 2002). Foram descritas inúmeras toxinas de serpentes que apresentam atividade analgésica (ABDEL-DAIM, 2015), antimicrobiana (SAMY, 2012), antiviral, como o vírus da herpes (HUBBARD, 2012), febre amarela e dengue (MULLER, 2012), antiparasitária contra *Leishmania sp* (PASSERO, 2007), antifúngica (YAMANE, 2013) e anticancerígena (GOMES et al., 2010).

A pesquisa de Marsh e Williams (2005) destacou o papel das TLEs como agentes anticoagulantes na terapia e prevenção de desordens trombóticas. Foi descrito o uso desses agentes em tratamentos de AVC isquêmico, de oclusão de artérias e veias por trombos. Assim como a prevenção de agregação plaquetária induzida por células tumorais e embolia pulmonar, sendo concluído que essas enzimas possuem grande importância para a medicina no campo terapêutico.

1.6 Proteínas recombinantes e expressão procariótica

A manipulação genética e a modificação genética compreendem os processos de manejo dos genes em um organismo, geralmente fora do processo normal reprodutivo deste. Envolve o isolamento, a manipulação e a introdução do DNA em um ser vivo, para expressar um gene. O objetivo é introduzir novas características em um ser vivo, podendo produzir assim, uma nova proteína ou enzima, por exemplo (VIEIRA, 2011).

Por meio da técnica de DNA recombinante foi possível desenvolver técnicas de produção de proteínas artificialmente a partir de genes clonados, as chamadas proteínas recombinantes. Atualmente, tem sido muito utilizada a obtenção de proteínas recombinantes para estudos biofísicos e estruturais, diagnósticos e terapêuticos, bem como aplicações em biomaterias (OLIVEIRA; DOMINGUES, 2017). Portanto, muitos estudos estão focados em encontrar diferentes formas de produzi-las de forma eficiente (MACAULEY-PATRICK, 2005).

Estudos realizados por Maeda *et al.* (1991) caracterizaram uma enzima recombinante que teve seu cDNA clonado para batroxobina e expresso em *E. coli*. A batroxobina tem potencial terapêutico no tratamento de doenças trombóticas, uma vez que a administração parenteral da enzima causa a conversão de fibrinogênio em um derivado de fibrina, que é

rapidamente degradado através de um processo fibrinolítico e, em seguida, eliminado pela urina.

A expressão procariótica tem sido muito explorada para a produção de proteínas terapêuticas, em larga escala. As células procarióticas (principalmente de *E. coli*) são preferíveis para a expressão de proteínas recombinantes por oferecem crescimento dependente de carbono acessível, acelerado acúmulo de biomassa e etapas dos processos simples (SAHDEV *et al.*, 2008).

A cepa BL21 de *E. coli* é um organismo ideal para a expressão proteica de alto nível, pois a BL21 e seus derivados são deficientes em proteases Lon e OmpT, uma modificação genética, responsável pelo aumento da estabilidade proteica e aumento na sensibilidade à produção de proteínas de genes clonados (www.neb.com/faqs/0001/01/01/what-are-the-strain-properties-c2566).

As células BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL possuem cópias extras de tRNAs para contornar as restrições mais frequentes de tradução de genes heterólogos ricos em sequências nucleotídicas GC. Esta cepa resgata a expressão de proteínas heterólogas de organismos que possuem genomas abundantes em sequências nucleotídicas AT ou GC, reduzindo assim as chances de formação de proteínas truncadas, formando proteínas ativas de comprimento total (SAHDEV,2008).

1.7 Justificativa

Em decorrência do potencial terapêutico apresentado pelas biomoléculas isoladas do veneno de serpentes, incitou-se a atenção dos pesquisadores para caracterizar e entender os mecanismos de ação dessas biomoléculas. Portanto, a partir de cada descoberta torna-se mais

claro o conhecimento das interações entre as toxinas e os fatores da hemostasia, fazendo com que possíveis aplicações terapêuticas sejam de fato acessíveis.

Considerando as características descritas desde a caracterização da Bhalternina até o potencial terapêutico, o uso da biotecnologia para obtenção dessa proteína na forma recombinante amplia o campo de pesquisa, promovendo novas perspectivas para o uso desse agente anticoagulante sintetizado, a partir de bioengenharia, em terapias eficazes nas patologias do sistema circulatório.

2. OBJETIVOS

2.2 Objetivo Geral

Realizar clonagem e expressão da enzima Bhalternina da serpente *Bothrops alternatus* em sistema bacteriano.

2.3 Objetivos Específicos

- 1) Isolar o fragmento que codifica a Bhalternina e o vetor de expressão;
- 2) Construir o plasmídeo recombinante para a expressão da Bhalternina
- 3) Introduzir o plasmídeo construído em bactéria apropriada para expressão da proteína;
- 4) Realizar a expressão da Bhalternina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do segmento que codifica a Bhalternina

O clone bacteriano contendo o plasmídeo denominado pPICBH1 (Figura 1), que possui a sequência codificante da Bhalternina, apresenta 8761pb e se encontra armazenado em bactérias TOP 10 a -80°C. Esse clone foi cultivado em meio 2xYT (triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 0,5%), contendo ampicilina a 100 µg/mL, à 37°C *overnight* e em seguida a amostra de DNA plasmidial foi purificada com o kit *QIAprep Spin Miniprep* seguindo as instruções do fabricante (QIAGEN, Hilden, Alemanha). A amostra de DNA plasmidial purificada foi digerida com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Not* I para isolar o segmento de interesse, que se encontra entre esses sítios de restrição, e foi obtida a sequência nucleotídica que codifica a Bhalternina.

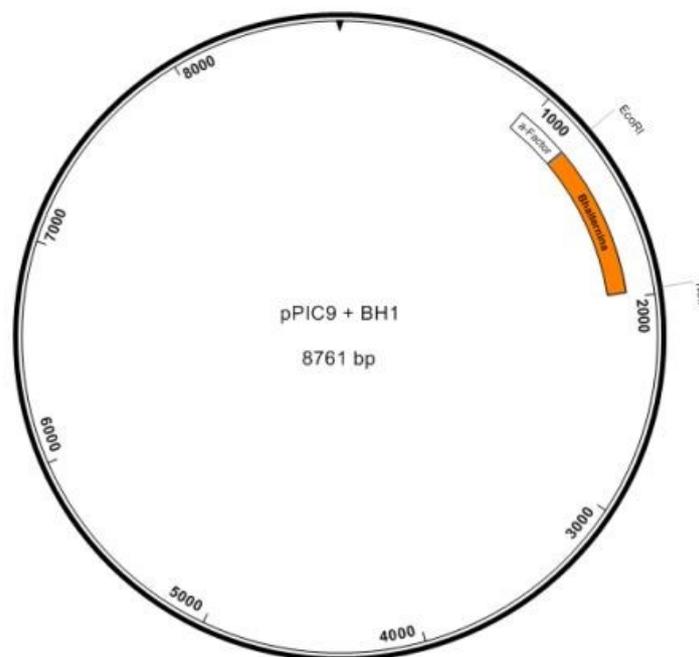


Figura 2: Esquema do mapa físico do DNA pPICBH1. O esquema apresenta o plasmídeo formado pelo vetor pPIC9 com a inserção da sequência nucleotídica que codifica a Bhalternina (BH1).

3.2 Obtenção do vetor de expressão pGS21a

O clone bacteriano contendo pGS-21a (GenScript, Piscataway, EUA), o vetor de expressão que foi utilizado para inserção do segmento codificante da Bhalternina (Figura 2), foi cultivado em meio 2xYT (triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 0,5%), contendo ampicilina 100 µg/mL, à 37°C *overnight* e em seguida a amostra de DNA plasmidial foi purificada conforme descrito acima. O plasmídeo purificado foi digerido com as enzimas *Eco*RI e *Not*I para inserção do fragmento de interesse.

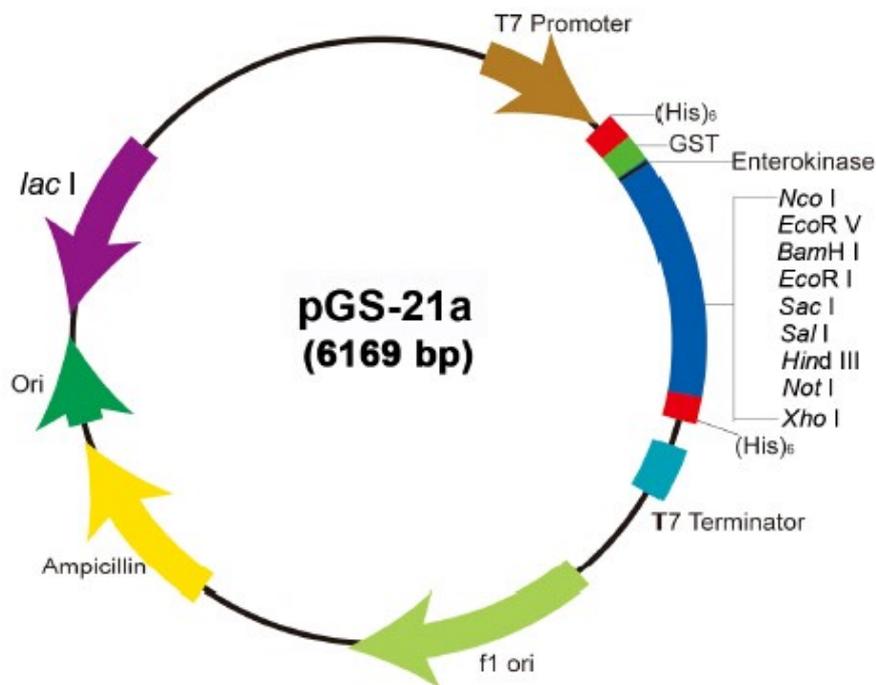


Figura 3: Esquema do mapa físico do vetor pGS21a. O esquema apresenta a região de múltipla clonagem com os sítios de restrição que compõem o plasmídeo. Fonte: adaptado de GenScript (2016).

3.3 Construção do plasmídeo com a sequência codificante da Bhalternina

A sequência nucleotídica que codifica a Bhalternina e o vetor purificado e digerido pGS21a (GenScript) foram submetidos à reação de ligação pela enzima T4 DNA Ligase

(ThermoFisher/Fermentas, Waltham, EUA) seguindo o protocolo DNA Insert Ligation (sticky-end) into Vector DNA Thermo Fisher Scientific (2012).

3.4 Transformação de células de *E.coli* competentes por eletroporação

Uma alíquota da reação de ligação foi utilizada na transformação da bactéria *E. coli*, cepa TOP10, por eletroporação com o equipamento *MicroPulser electroporator* BioRad (Hercules), foi utilizado com o programa Ec1 (pulso de 1,80kV) em cubeta 0,1cm, conforme especificado no manual do equipamento. Após a eletroporação, as células foram cultivadas em placas de Petri com meio de cultura LB (extrato de levedura 1%, triptona 0,5%, NaCl 1%, ágar 2%) contendo ampicilina 100 µg/ml para obtenção de colônias transformantes.

3.5 Análise do DNA plasmidial

Algumas colônias foram selecionadas e submetidas a PCR para confirmar a presença do gene codificante da Bhalternina. A mistura de reação (Tampão completo II KCl 1x Bioron, dNTPs 0,2 mM Sigma, *primer* FRT7 0,3 µM, *primer* BH187RV (CGTCTTCATTGGTGACGTTCTTA) 0,3 µM, 1U *Taq* DNA polimerase Invitrogen e H₂O para biologia molecular para volume final de 20 µL) foi distribuída em tubos de PCR, a amplificação foi feita a 94 °C por 10 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 45° C por 30 s e 72° C por 1,5 min e por último 72° C por 7 min.

Após amplificação, essas amostras foram analisadas por gel de agarose 0,5% e uma amostra que teve a amplificação do segmento de tamanho esperado foi purificada com o kit *QIAquick PCR Purification* da empresa QIAGEN e submetida a sequenciamento com os *primers* PGEXFR (TGCAGGGCTGGCAAGCCACG) e E2RVNOT1 (CGCGCGGCCGCTTGTTAGCAGCCGGATCTCA).

3.6 Obtenção do clone bacteriano para expressão da Bhalternina

O DNA do plasmídeo construído com a sequência codificante de Bhalternina foi utilizado na transformação de *E. coli*, cepa BL21-CodonPlus (DE3) -RIPL (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) por eletroporação. As células transformadas foram cultivadas em placas de Petri com meio LB contendo ampicilina 100 µg/ml e cloranfenicol 34 µg/ml e algumas colônias foram selecionadas para confirmação da presença do gene da Bhalternina nesses clones por meio de PCR com os *primers* PGEXFR e E2RVNOT1.

3.7 Triagem de expressão dos clones

Dez colônias selecionadas foram submetidas a triagem para expressão da Bhalternina a fim de avaliar os clones com níveis de expressão mais altos. A expressão foi realizada conforme o protocolo de expressão BL21-CodonPlus Competent Cells instructional manual Agilent (2005). Os clones foram inoculados em 1ml de meio 2xYT contendo ampicilina 100 µg/ml e cloranfenicol 34 µg/ml à 37° C *overnight* em *shaker*. Como controle, foi utilizado o clone BL21(DE3)A o qual possui o vetor pGS21a. No dia seguinte, 100 µl dessas culturas foram inoculadas em 1ml de meio 2xYT sem antibióticos por 3 h à 37° C em *shaker* e após esse período foi adicionado isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) para concentração final de 0,9 mM para induzir a expressão da proteína, durante 3 h à 37° C em *shaker*.

Após o término do período de indução as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o *pellet* foi ressuspensão com 50 µl de água Milli-Q e 50 µl de 2x Stop Solution (azul de bromofenol 0,4%; Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; glicerol 40%, SDS 2%). Após incubação a 95°C por 10 min, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) contendo 5% de poliacrilamida para o gel de empilhamento e 14% para o gel de separação e, em seguida, o gel foi corado com *Coomassie Blue*.

3.8 Expressão da Bhalternina

Os clones que apresentaram maior nível de expressão, assim como o clone controle, foram inoculados em 4 ml de meio 2xYT contendo ampicilina 100 µg/ml e cloranfenicol 34 µg/ml à 37° C *overnight* em *shaker*. No dia seguinte 4 ml das culturas foram transferidas para 40 ml de meio 2xYT sem antibióticos, exceto pelo clone 6 que teve 2 ml transferidos para 40 ml de meio contendo antibióticos e 2 ml transferidos para meio sem antibióticos (6a), seguindo-se de incubação por 3 h à 37° C em *shaker*. Em seguida, foi adicionado IPTG para concentração final de 0,9 mM para induzir a expressão da proteína, durante 3 h à 37°C em *shaker* e após esse período as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o *pellet* dos clones armazenado a - 20°C.

3.9 Lise Celular

Os *pellets* foram ressuspensos com 200 µl de tampão de lise (Tris-HCl 45 mM, NaCl 0,07 M, pH 8) e à suspensão foram adicionados 2 µl de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 mM e 2 µl de lisozima 10 mg/ml, seguidos de incubação por 10 min a 4° C. Em seguida, foram realizados quatro ciclos de congelamento, por 5 min a -20 °C com álcool absoluto, seguido de descongelamento à temperatura ambiente. Após os ciclos de congelamento e descongelamento foram adicionados aos lisados 5 µl de DNase I 2 U/µl e 5 µl de MgCl₂ 25 mM, e as misturas foram incubadas à temperatura ambiente durante 30 min.

Os lisados foram centrifugados a 15000 xg por 10 min e tanto o sobrenadante como o precipitado foram armazenados a -20 °C. Aliquotas dos *pellets* e dos sobrenadantes foram submetidas a análise por SDS-PAGE, contendo 5% de poliacrilamida para o gel de empilhamento e 12% para o gel de separação e, em seguida, o gel foi corado com *Coomassie Blue*.

3.10 Eletroforese de proteínas

A eletroforese de proteínas foi realizada por SDS-PAGE 14% e SDS-PAGE 12%, conforme o manual de laboratório de Sambrook and Russel (2001). O SDS-PAGE consistiu em gel de separação 14% ou 12% e de empilhamento 5%. Para fazer o gel de separação foi preparada uma mistura que continha SDS 10%, Tris-HCl pH 8,8 1,5 M, persulfato de amônio 10% e TEMED 100%. Já o gel de empilhamento 5%, que é onde foram feitos os poços e aplicadas as amostras, continha SDS 10%, Tris-HCl pH 6,8 1,0 M, persulfato de amônio 10% e TEMED 100%. Como marcadores de massa molecular, utilizou-se as proteínas fosforilase b (97,000), albumina de soro bovino (66,000), ovoalbumina (45,000), anidrase carbônica (30,000), inibidor de tripsina de soja (20,100) e α -lactalbumina (14,400). Além disso, a eletroforese foi realizada a 200 V e tampão Tris-glicina pH 8,3 contendo SDS 0,01%. Para visualização do resultado, o gel foi corado com *Coomassie Blue* R-250, 0,2% (p/v), em ácido acético:metanol (50:10, v/v).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento do fragmento que codifica a Bhalternina e o vetor de expressão

Os clones bacterianos contendo o vetor pGS21a e o clone contendo pPICBH1 tiveram seu DNA plasmidial purificados e essa purificação foi confirmada através da análise do perfil eletroforético em gel de agarose. Foi possível observar no gel (Figura 3), as bandas correspondentes ao DNA plasmidial, constatando que os plasmídeos foram purificados corretamente.



Figura 4: Eletroforese em gel de agarose das amostras de DNA de pPICBHI e pGS21a. O gel de agarose foi realizado na concentração de 0,5% e o padrão de peso molecular utilizado foi de 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas).

Após a digestão do DNA dos plasmídeos com as enzimas de restrição *EcoR I* e *Not I*, as amostras foram novamente purificadas para obtenção do fragmento isolado que codifica a Bhalternina e afim de preparar o sítio de clonagem do vetor, para inserção desse fragmento. Essa purificação foi confirmada por eletroforese com gel de agarose, indicando que o DNA foi purificado corretamente, sendo possível sua utilização na reação de ligação. Os produtos purificados após a digestão com enzimas de restrição, foram submetidos a uma reação de ligação (Figura 4). Com base no resultado do gel, concluiu-se que a reação de ligação foi de fato realizada, devido a observação de bandas de peso molecular diferentes dos pesos moleculares do vetor e do fragmento da Bhalternina.

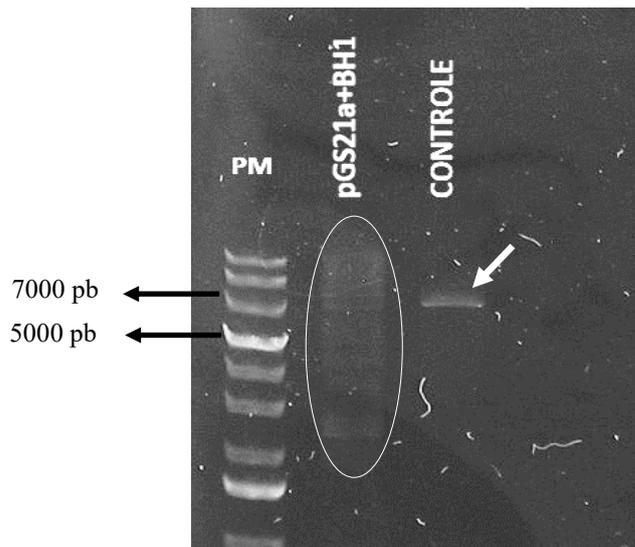


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose da reação de ligação do vetor com o fragmento de interesse. O gel de agarose foi realizado na concentração de 0,5% e o padrão de peso molecular utilizado foi de 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas). A seta indica uma banda de peso molecular referente a aproximadamente 7000 pb e o círculo sinaliza diversos fragmentos de DNA com diferentes pesos moleculares. O controle corresponde a reação do vetor com a enzima ligase apenas.

4.2 Construção do plasmídeo recombinante para a expressão da Bhalternina

A reação de ligação foi introduzida em células eletrocompetentes de *E.coli*, cepa TOP 10 por eletroporação (Figura 5). Dez colônias transformantes foram selecionadas para identificação do DNA plasmidial através de PCR e o resultado da eletroforese em gel de agarose demonstrou que houve a amplificação de um segmento de tamanho próximo do esperado (954 pb) com 9 das colônias (Figura 6).

De acordo com os estudos de Costa *et al.* (2010), a partir do produto amplificado por PCR com a amostra da Bhalternina isolada da peçonha de *B. alternatus*, identificou-se um fragmento de cDNA de 780 pb que codifica para uma proteína madura de 236 resíduos de aminoácidos, correspondendo a um peso molecular de 25,3 kDa. Afim de não se perder nenhuma sequência codificante importante da Bhalternina, neste estudo foram utilizados

primers presentes antes e após dos sítios de restrição, ocasionando em um fragmento maior que o descrito pela literatura.



Figura 6: Colônias de bactérias TOP 10 transformadas cultivadas em placas de meio LB com Ampicilina. As colônias mais isoladas foram enumeradas e selecionadas para detecção de DNA por PCR. Na placa A, foi utilizada a suspensão bacteriana original, após a eletroporação, e na placa B, a suspensão bacteriana original foi diluída 10 vezes.

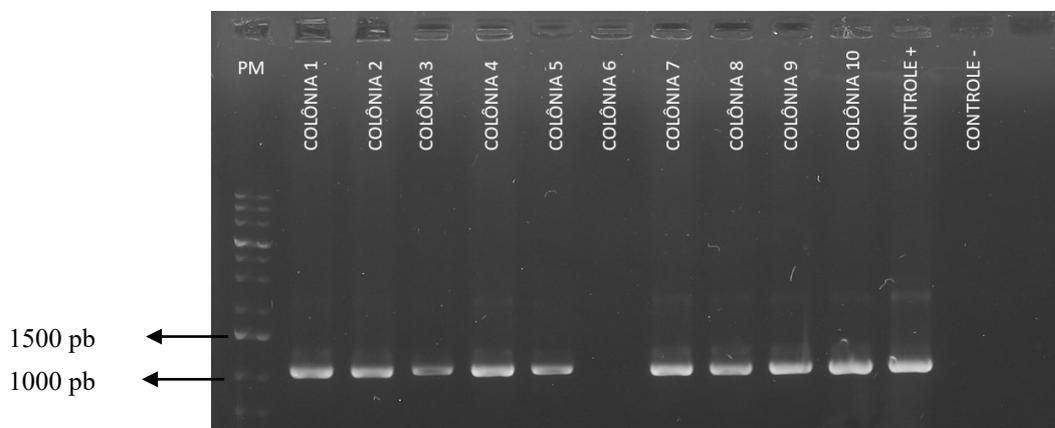


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com colônias transformadas. O gel de agarose foi realizado na concentração de 0,5% e o padrão de peso molecular utilizado foi de 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas). O controle positivo usado foi a reação de ligação pGS21a+BH1 e o controle negativo usado foi a mix da PCR.

Os DNAs plasmidiais dos clones 2 e 7 foram obtidos e o do clone 2, denominado pGSBH2, teve sua sequência codificante da Bhalternina confirmada por sequenciamento nucleotídico (Figura 7). A sequência codificante para 6 resíduos de histidina (6xHis) foi

observada, assim como a sequência DDDDK, que é a sequência de reconhecimento e clivagem por enteroquinase, para remoção dessas sequências da molécula da Bhalternina, cuja forma madura inicia-se pelo resíduo de valina até o stop códon. Com base no sequenciamento obtido foi possível deduzir o mapa virtual do pGSBH2 (Figura 8).

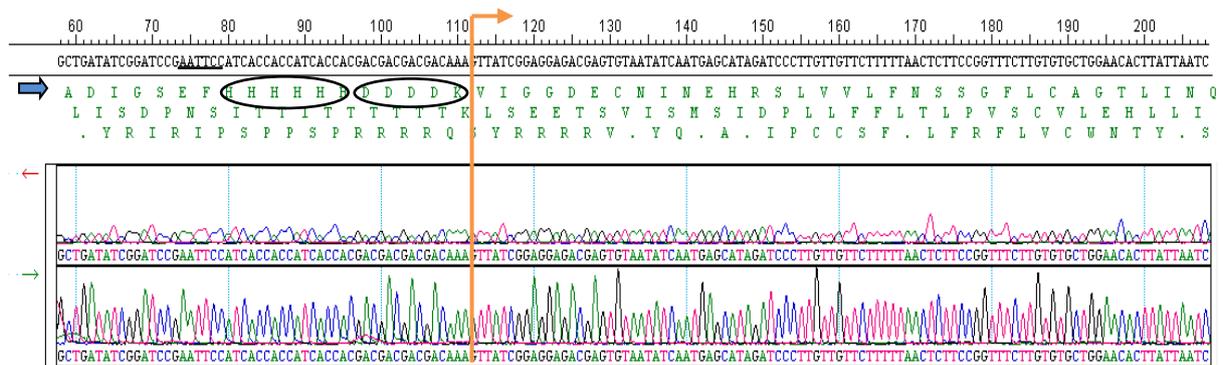


Figura 8: Análise do início do segmento de bhalternina sequenciado. A linha superior mostra a sequência nucleotídica e o sítio para *Eco RI* está sublinhado. A seta azul indica a fase de leitura correta. As partes circuladas indicam a sequência codificante 6xH e a sequência de reconhecimento e clivagem por enteroquinase, respectivamente. A seta alaranjada indica o início da sequência codificante da Bhalternina madura. A parte inferior mostra os eletroferogramas obtidos com as reações de sequenciamento.

As cadeias de seis a nove resíduos de histidina, conhecidas como His-tag, são muito utilizadas em vetores para produção de proteínas recombinantes. As proteínas expressas marcadas com 6xHis podem ser purificadas e detectadas facilmente devido a facilidade que os resíduos de histidina possuem de se ligar a vários tipos de íons metálicos imobilizados (BORNHORST; FALKE, 2000). Além disso, várias empresas comercializam anticorpos contra a sequência, como por exemplo o anticorpo MA1-135 (ThermoFisher Scientific), para a detecção em testes ELISA, Western blot ou ainda imunofluorescência.

A enteroquinase é uma enzima que converte o tripsinogênio em tripsina por clivagem após o peptídeo N-terminal, Valina-Aspartato-Lisina, ativando zimogênios pancreáticos. A enteroquinase recombinante é muito útil na produção de proteínas recombinantes usando tecnologia de proteína de fusão, devido ao alto grau de especificidade em relação às sequências de Aspartato-Lisina, e tem sido comercializada por várias empresas (Merck,

GenScript, ThermoFisher). Essa protease reconhece e cliva após a extremidade C-terminal do resíduo de lisina na sequência de reconhecimento, DDDDK, sem deixar resíduos de aminoácidos nos produtos peptídicos clivados (CHOI *et al.*, 2001). Em etapas futuras, esta enzima poderá ser utilizada para clivar a GST-Bhaltermina expressa por nossos clones, removendo assim a GST e a 6xHis da Bhaltermina.

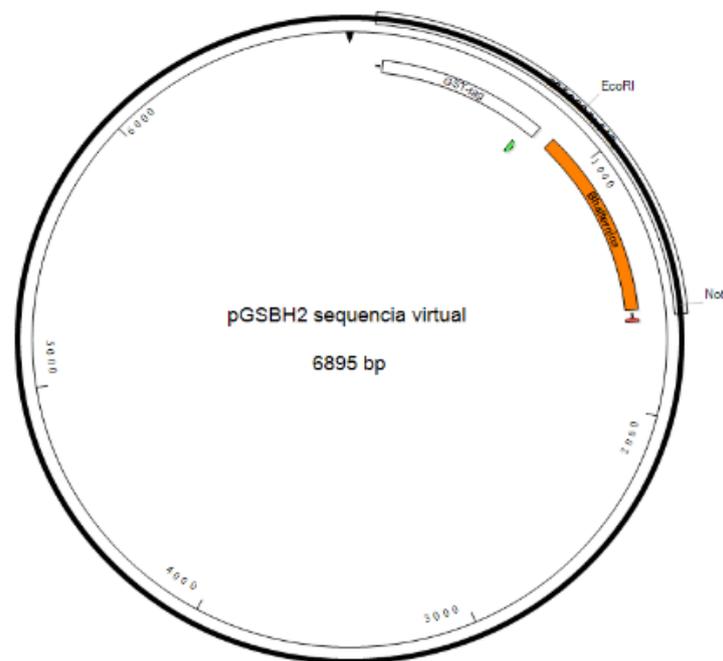


Figura 9: Mapa virtual do plasmídeo construído pGSBH2. A sequência codificante da Bhaltermina está em alaranjado.

4.3 Introdução do plasmídeo construído em bactéria apropriada para expressão

A partir do resultado do sequenciamento, o DNA purificado pGSBH2 foi inserido em bactérias eletrocompetentes de *E.coli*, cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL (Agilent) por eletroporação (Figura 9). Dez colônias foram selecionadas para confirmar a presença do DNA pGSBH2 por PCR. O resultado da eletroforese em gel de agarose (Figura 10) inferiu que

todas as colônias foram positivas para o DNA pGSBH2, pois houve a amplificação de um segmento de tamanho esperado (954 pb).



Figura 10: Colônias de bactérias BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL transformadas cultivadas em placas de meio LB. As colônias mais isoladas foram enumeradas e selecionadas para detecção de DNA por PCR.

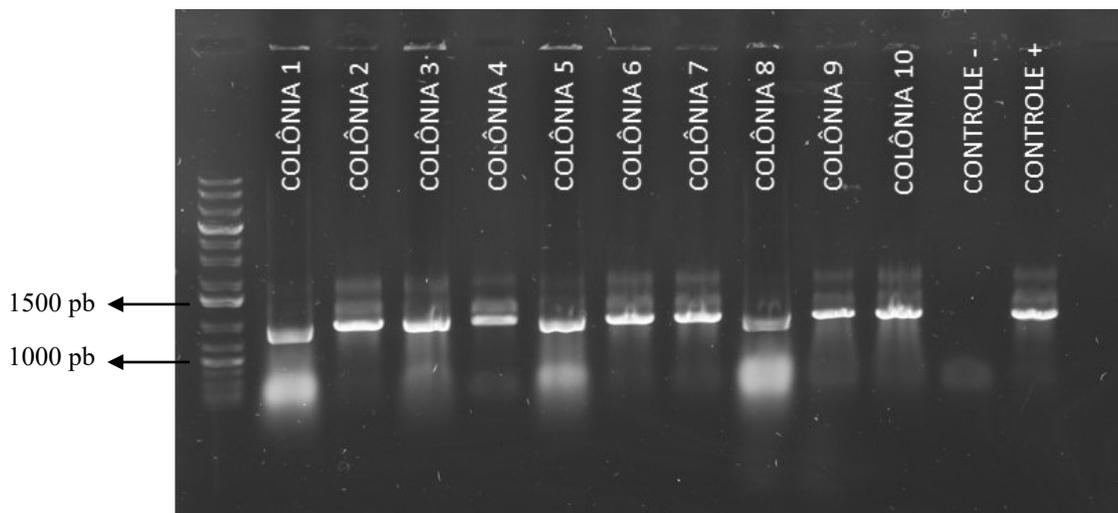


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com colônias de BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL transformadas. O gel de agarose foi realizado na concentração de 0,5% e o padrão de peso molecular utilizado foi de 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas). O controle positivo usado foi o DNA pGSBH2 e o controle negativo usado foi a mix da PCR.

4.4 Expressão da Bhalternina

Todas as 10 colônias que tiveram a presença do DNA de pGSBH2 confirmada foram submetidas a uma triagem de expressão a partir de indução com IPTG e analisadas por SDS-

PAGE 14% (Figura 11). Foi possível observar uma banda mais intensa de aproximadamente 56 kDa, massa molecular próxima ao estimado, com amostras de clones transformadas com pGSBH2, indicando a expressão da Bhalternina fusionada com GST, baseado na soma dos pesos moleculares de ambas as proteínas. O controle, representado pelo vetor de expressão, apresentou banda proteica intensa com massa molecular próxima de 32 kDa.

A glutathiona S-transferase (GST) é uma proteína cuja sequência de DNA geralmente é inserida em vetores de expressão para a produção de uma proteína de fusão marcada com GST. Essas proteínas podem ser purificadas ou detectadas com base na capacidade da GST se ligar ao seu substrato, a glutathiona, que quando reduzida é imobilizada através de seu grupo sulfidril a um suporte sólido, sendo possível capturar proteínas GST puras ou marcadas com GST (FRANGIONI; NEEL, 1993).

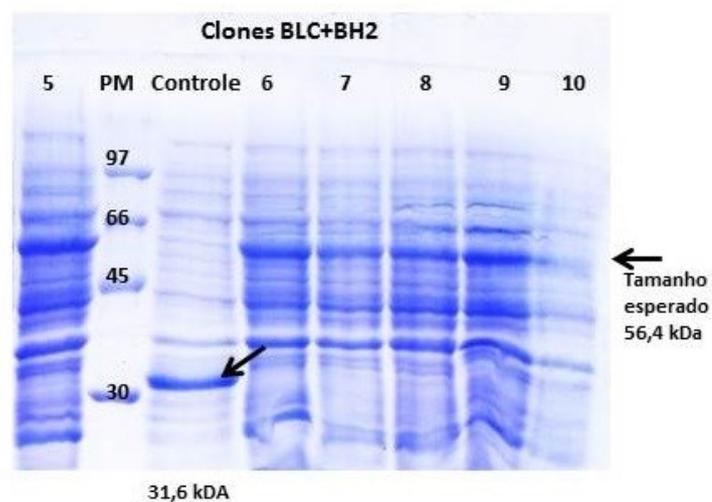


Figura 12: Eletroforese em gel de poliacrilamida das culturas da triagem de expressão. O gel de poliacrilamida foi realizado na concentração de 14% e o padrão de peso molecular utilizado foi a Low MW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare). As setas indicam uma proteína de aproximadamente 56 kDa e 32 kDa, dos clones transformados com pGSBH2 (5 a 10) e o controle, respectivamente.

Os clones 5 e 6 foram selecionados por apresentarem bandas proteicas mais intensas e submetidos a expressão da Bhalternina em maior escala, sendo que o clone 6 teve seu nível de expressão avaliado com base no uso ou não de antibióticos no segundo inóculo. Esses clones

após o término da expressão foram lisados e tanto o sobrenadante quanto o *pellet* foram analisados por SDS-PAGE 12%. A partir da eletroforese, bandas proteicas com massas moleculares próximas as esperadas foram observadas para o controle (vetor pGS21a) e para os clones contendo a sequência codificante de Bhalternina. Foi possível visualizar que os precipitados apresentaram bandas proteicas mais intensas, indicando que a proteína recombinante foi expressa, mas se manteve no precipitado provavelmente devido a formação de corpos de inclusão insolúveis (Figura 12).

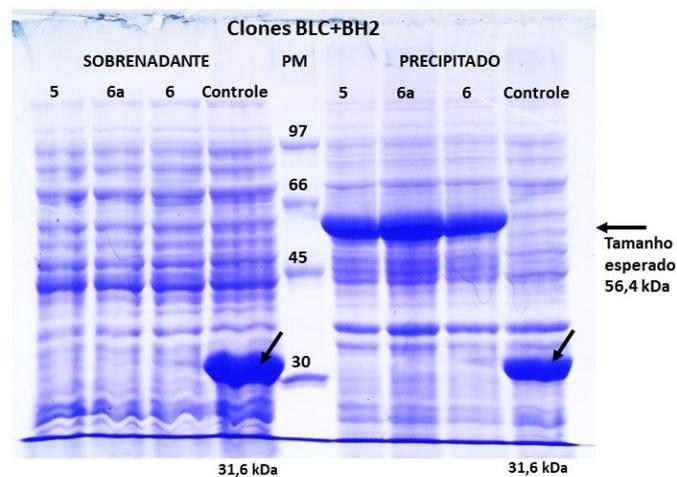


Figura 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida das culturas com clones de maior expressão. Foram utilizados os clones 5 e 6 assinalados nas raiais. As setas indicam uma proteína de aproximadamente 56 kDa (de massa molecular esperada para a proteína de fusão contendo GST e Bhalternina) para os clones transformantes e de 32 kDa (somente GST) para o controle. Amostra 6a corresponde ao clone 6 cultivado na presença de antibióticos. PM: padrão de peso molecular Low MW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare).

Durante o dobramento de uma proteína, a associação intermolecular de domínios hidrofóbicos é responsável pela formação de corpos de inclusão, tornando as proteínas insolúveis e causando a precipitação das mesmas. As proteínas marcadas com 6xHis presentes em corpos de inclusão insolúveis podem ser facilmente solubilizadas com desnaturantes e detergentes (The QIAexpressionist, 2003).

Além disso outros fatores relacionados as condições de expressão podem ser ajustadas afim de reduzir a insolubilidade das proteínas. Esses fatores englobam temperaturas mais

baixas de cultivo após indução, densidade celular elevada antes da indução, redução da concentração de IPTG e adição de sais metálicos ao meio de cultura, favorecendo a estabilidade de proteínas na forma solúvel (The QIAexpressionist, 2003).

O lisado celular será submetido a etapas futuras, primeiramente, ao Western blot, utilizando anticorpo que reconhece a sequência 6xHis para confirmação da expressão da proteína de interesse, seguindo-se de etapas de purificação e de avaliação de atividades biológicas e enzimáticas.

5 CONCLUSÕES

- Foram obtidos clones bacterianos contendo o gene codificante da Bhalternina.
- A expressão da proteína recombinante da Bhalternina parece ter sido realizada com sucesso, uma vez que foi observada a expressão de uma proteína de massa molecular de tamanho esperado para a proteína de fusão GST+Bhalternina.
- Verificou-se a presença dessa proteína no precipitado do lisado celular.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-DAIM, M. M. et al. Analgesic, Antipyretic and Anti-inflammatory Activities of the Egyptian Spitting Cobra; *Naja nubiae* Venom. **Journal of Forensic Toxicology & Pharmacology**, v. 4, p. 261-265, 2015.
- BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**, 2 ed. Manole, São Paulo, 1991.
- BERNARDES, C. P. et al. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**. v. 51, p. 574–584, 2008.
- BORNHORST, J.A. AND FALKE, J.J. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. **Methods Enzymol.** 326: 245-254, 2000.
- BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, p. 851-859, 2000.
- CARDOSO, K.C.; SILVA, M.J.; COSTA, G.G.L.; TORRES, T.T.; DEL BEM, L.E.; VIDAL, R.O.; MENOSSI, M.; HYSLOP, S. A transcriptomic analysis of gene expression. In the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics**, v. 11, p. 605, 2010.
- COLLEN D. The plasminogen (fibrinolytic) system. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 82, p. 259-270, 1999.
- COSTA, J. O. et al. Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from *Bothrops alternatus* venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. 640-654, 2007.
- COSTA, J. O. et al. Bhalternin: functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. **Toxicon**, v. 55, n. 7, p. 1365-1377, 2010.
- COTRAN, R. S. et al. Distúrbios hemodinâmicos, trombose e choque. **Cotran RS, Kumar V. & Collins T. Robbins: Patologia Estrutural e Funcional**, v. 6, 2000.
- CHOI, S.I., SONG, H.W., MOON, J.W., AND SEONG, B.L. Recombinant Enterokinase Light Chain with Affinity Tag: Expression from *Saccharomyces cerevisiae* and Its Utilities in Fusion Protein Technology. **Biotechnol. Bioeng.** 75: 718-724, 2001.
- FAVARETTO, J. A. **Biologia: Unidade e Diversidade**, v. 2, 1 ed, 288 p, São Paulo, 2016.
- FRANGIONI, J. V., NEEL, B. G. Solubilization and Purification of Enzymatically Active Glutathione S-Transferase (pGEX) Fusion Proteins. **Analytical Biochemistry**, 210(1), 179–187, 1993.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2. ed. 2001. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu_peconhentos.pdf>. acessado em 26/11/17.
- GARCIA, L. T.; PARREIRAS e SILVA, L. T.; RAMOS, O. H.; CARMONA; A. K.; BERSANETTI, P. A.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. The effect of post translational

modifications on the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 138, p. 23–32, 2004.

GOMES, A. et al. Anticancer potential of animal venoms and toxins. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.48, p. 93-103, 2010.

GUYTON A. C. & HALL J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**, 10 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002.

HUBBARD, S. et al. Contortrostatin, a homodimeric disintegrin isolated from snake venom inhibits herpes simplex virus entry and cell fusion. **Antiviral therapy**, v. 17, n. 7, p. 1319, 2012.

KINI, R. M. et al. Procoagulant proteins from snake venoms. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 31, n. 3-6, p. 218-224, 2002.

LESK, A. M.; FORDHAM, W. D. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. **Journal Molecular Biology**, v. 258, p. 501-537, 1996.

MACAULEY-PATRICK, S. et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249-270, 2005.

MAEDA, M. et al. Expression of cDNA for Batroxobin, a Thrombin-Like Snake Venom Enzyme. **Journal of Biochemistry**, v. 109, n 4, p. 632-637, 1991.

MAGALHÃES, A. et al. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 565-575, 2007.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**. v. 36, n. 12, p. 1749-1800, 1998.

MARKLAND JR, F. S. Inventory of α and β fibrinogenases from snake venoms. **Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH**, v. 65, p. 438–443, 1991.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1171–1181, 2005.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 146–156, 2000.

MELGAREJO, A. F. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: Cardoso J.L.C., França F.O.S., Wen F.H., Málque C.M.S & Haddad Jr V. (ed.) **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. Sarvier: São Paulo, 2003, p. 33-61.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Saiba como evitar a trombose**. 2016. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2016/09/saiba-como-evitar-a-trombose>>. Acessado em: 04/12/2017.

MULLER, V. D. M. et al. Crotoxin and phospholipases A2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 507-515, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6. ed. New York: W.H. Freeman, 2013.

NORIVAL, A. SANTOS-FILHO et al. Heterologous expression and biochemical and functional characterization of a recombinant alpha-type myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* snake. **Biochimie**, v. 105, p. 119-128, 2014.

OLIVEIRA, C.; DOMINGUES, L. Guidelines to reach high-quality purified recombinant proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, pp. 1-12, 2017.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Doenças cardiovasculares**. 2017. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096>. Acessado em: 02/02/2019.

PASSERO, L. F. D. et al. Anti-leishmania activity of semi-purified fraction of *Jacaranda puberula* leaves. **Parasitology research**, v. 101, n. 3, p. 677-680, 2007.

QIAGEN. **QIAprep Miniprep Handbook**: For purification of molecular biology grade DNA. 4. ed., 42 p., 2015.

QIAGEN. **QIAquick Multiwell PCR Purification Handbook**: For rapid purification of multiple PCR products. 9. ed., 32 p., 2003.

QIAGEN. **QIAquick Spin Handbook**. 11. ed., 44 p., 2018.

QIAGEN. **The QIAexpressionist**: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 6. ed., 127 p., 2003.

RAMOS, O. H. P.; CARMONA, A. K.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Expression, refolding, and in vitro activation of a recombinant snake venom pro metalloprotease. **Protein Expression and Purification**, v. 28, p. 34-41, 2003.

SAHDEV, S., KHATTAR, S.K. & SAINI, K.S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 307, p. 249-264, 2008.

SAMBROOK, J.F. & RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMY, R. P. et al. Snake venom phospholipases A2: a novel tool against bacterial diseases. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 36, p. 6150-6162, 2012.

SBACVRJ (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANGIOLOGIA E CIRURGIA VASCULAR-REGIONAL RIO DE JANEIRO). **Cartilha da semana vascular: O que você precisa saber sobre doenças venosas**. 2009. Disponível em:<<http://sbacvrj.com.br/novo/downloads/cartilhas/semanavascular/iv.pdf>>. Acessado em: 04/12/2017.

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

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

SETUBAL, S.S.; PONTES, A.S.; FURTADO, J.L.; XAVIER, C.V.; SILVA, F.L; KAYANO, A.M.; IZIDORO, L.F.M.; SOARES, A.M.; CALDERON, L.A.; STÁBELI, R.G.; ZULIANI, J.P. Action of Two Phospholipases A₂ Purified from *Bothrops alternatus* Snake Venom on Macrophages. **Biochemistry**, v. 78, n. 2, p. 194-203, 2013.

SVS/MS (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE). **Acidentes por animais peçonhentos**. 2014. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos/13713-descricao-da-doenca>>. Acessado em: 12/11/2017.

SWENSON, M. J. Circulação sanguínea e sistema cardiovascular. In: Swenson M.J. & Reece W.O. Dukes **Fisiologia dos Animais Domésticos**, 11 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996.

SWENSON, S.; MARKLAND, F. S. Snake venom fibrin (ogen) olytic enzymes. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1021-1039, 2005.

TEIXEIRA, C.F.; LANDUCCI, E.C.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 42, n.8, p. 947-962, 2003.

THERMO SCIENTIFIC. **DNA Insert Ligation (sticky-end and blunt-end) into Vector DNA**. 1 p., 2012.

TYNDALL, J. D. A; NALL, T.; FAIRLIE, D. P. Proteases universally recognize beta strands in their active sites. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 3, p. 973-1000, 2005.

VIDEIRA, ARNALDO, **Engenharia Genética: Princípios e Aplicações**. 2ª Ed. Lidel, 2011.

YAMANE, E. S. et al. Unraveling the antifungal activity of a South American rattlesnake toxin crotamine. **Biochimie**, v. 95, n. 2, p. 231-240, 2013.