

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
APLICADAS

MAYARA GARCIA POLLI

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA BALTERNINA, UMA SERINOPROTEASE DE  
*Bothrops alternatus* (URUTU), EM SISTEMA DE CÉLULAS DE BACTÉRIA E DE  
LEVEDURA**

UBERLÂNDIA – MG  
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIA BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
APLICADAS

MAYARA GARCIA POLLI

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA BALTERNINA, UMA SERINOPROTEASE DE  
*Bothrops alternatus* (URUTU), EM SISTEMA DE CÉLULAS DE BACTÉRIA E DE  
LEVEDURA**

Dissertação apresentada ao colegiado do  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia  
e Parasitologia Aplicadas como parte de  
obtenção do título de Mestre.

**Orientador:** Prof. Dr. Jonny Yokosawa

UBERLÂNDIA – MG  
2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

P774 2019	<p>Polli, Mayara Garcia, 1995- Clonagem e Expressão da Balternina, uma Serinoprotease de <i>Bothrops alternatus</i> (Urutu), em Sistemas de Célula de Bactéria e Levedura [recurso eletrônico] / Mayara Garcia Polli. - 2019.</p> <p>Orientador: Jonny Yokosawa. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2226">http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2226</a> Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Imunologia. I. Yokosawa, Jonny , 1966-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 612.017</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Mayara Garcia Polli**

“Clonagem e Expressão da Bhalternina, uma Serinoprotease de *Bothrops alternatus* (Urutu), em Sistemas para Expressão em Células Bacteriana e de Levedura”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 18 de julho de 2019.

Profª. Dra. Júlia de Oliveira Costa - IFTM

Prof. Dr. Edigar Henrique Vaz Dias - UFU

Prof. Dr. Jonny Yokosawa - ICBIM/UFU (orientador) – ICBIM/UFU

“ Ama-se mais o que se conquista com esforço. ”

(Benjamin Disraeli)

À Deus, agradeço por ser a minha luz. Dedico também aos meus pais, irmã, namorado, amigos, e ao professor Jonny por todo apoio, colaboração e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus, por me abençoar e iluminar, por ser meu porto seguro, e estar sempre me amparando nas horas mais difíceis. Sem Ele, eu nada seria.

Sou grata também aos meus pais, Alexandre e Luciane, que sempre estiveram ao meu lado, me incentivando e me dando apoio em todas as minhas decisões. Por nunca medirem esforços para fazer o que fosse melhor para mim.

Agradeço à minha irmã, Giulia, e ao meu namorado, Caio, por serem meus companheiros de todas as horas, por toda paciência, apoio e carinho. Por sempre tornarem as dificuldades mais leves.

Gostaria de agradecer também aos meus amigos, que sempre estiveram torcendo por mim. Aos amigos do laboratório, que me acompanharam durante esta trajetória e sempre me ajudaram no que foi preciso.

Não poderia deixar de agradecer a Thelma, por toda ajuda e por ter sempre uma palavra de conforto. E também ao meu professor e orientador, Jonny, que foi o mentor desse trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos, pela paciência, confiança e por tornar possível a realização desta conquista.

Muito obrigada!

Mayara Garcia Polli

## RESUMO

As peçonhas são compostas por uma série de componentes orgânicos e não-orgânicos que parecem mostrar atividade contra vírus e bactéria, bem como ação terapêutica em distúrbios tromboticos. Portanto, a caracterização de biomoléculas presentes nas peçonhas é importante para o desenvolvimento de terapias alternativas. A Balternina, uma toxina presente na peçonha de *Bothrops alternatus*, é uma enzima semelhante à trombina e possui um importante papel em casos de distúrbios tromboticos. Tendo em vista isso, o presente estudo teve como objetivo realizar a clonagem e expressão da Balternina em sistema de células de bactéria e de levedura. A sequência codificante da Balternina madura foi clonada nos vetores pGS-21a e pPICZ $\alpha$  A e, após confirmação nucleotídica pelo método de Sanger, os plasmídeos pGSBH2 e pP $\alpha$ ABH9 construídos foram utilizados para a transformação da *Escherichia coli* (cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL) e *Pichia pastoris* (cepa X-33), respectivamente. Diferentes colônias que apresentaram a amplificação do DNA plasmidial pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foram purificadas, submetidas ao processo de expressão e, em seguida, foram avaliadas por eletroforese de proteínas e *Western blotting*. No sistema bacteriano, foi observada uma banda proteica correspondente a massa molecular da Balternina expressa com a proteína de fusão Glutathione-S-Transferase (GST), tanto na fração do sobrenadante quanto no *pellet*. Já no sistema de levedura, não foi possível identificar uma banda proteica correspondente a Balternina. Porém, ao avaliar a expressão por Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), foi possível identificar níveis de expressão em sistema de levedura. Ainda, no teste de coagulação realizado, o *pellet* do clone bacteriano tratado com ureia 3 M mostrou atividade, mas como o clone controle tratado com ureia 8 M também demonstrou atividade, os resultados foram inviabilizados. No teste de atividade azocaseinolítica, todas as amostras demonstraram atividade, inclusive as amostras controle. No caso da expressão em levedura, os resultados sugerem uma baixa expressão da Balternina, mesmo tendo sido realizada a otimização de códons para *P. pastoris*. Por outro lado, no sistema bacteriano, foi requerido o tratamento com ureia e isso causou alterações na atividade da proteína. Contudo, ainda é necessário realizar mais testes, modificando condições de cultivos, bem como realizar a purificação da Balternina presente no sobrenadante dos clones bacterianos, para que assim seja possível obter melhores resultados quanto a atividade enzimática da Balternina.

### Palavras-chave

Peçonha, Balternina recombinante, Serinoprotease, Sistemas de expressão



## ABSTRACT

Despite their toxicity, snake venoms are composed of a series of organic and non-organic components that show activities against virus and bacteria, as well as therapeutic activities in thrombotic disorders. Thus, the characterization of biomolecules present in venoms has shown to be important to develop alternative therapies. Bhalternin, a toxin from *Bothrops alternatus*, has been described as a thrombin-like enzyme and has a therapeutic potential in cases of thrombotic disorders. So, the present study had as objective to perform cloning and expression of Bhalternin in bacterial and yeast systems. The mature Bhalternin coding sequence was cloned into pGS-21a e pPICZ $\alpha$  A vectors and, after confirmation of the nucleotide sequences by Sanger Method, the plasmids that were constructed, pPGSBH2 e pP $\alpha$ ABH9, were utilized in the transformation of *Escherichia coli* (strain BL21-Codon-Plus(DE3)-RIPL) and the *Pichia pastoris* (strain X-33), respectively. Different colonies, which showed presence of plasmid DNA by Polymerase Chain Reaction, were purified, submitted to the expression process and, then, evaluated for Bhalternin expression by protein electrophoresis and Western blotting. In the bacterial system, a protein band corresponding to the expected molecular weight of Bhalternin expressed as fusion protein with glutathione S-transferase (GST) was observed in the supernatant and in the precipitate of bacterial lysate. However, in yeast system, it was not possible to identify a protein band corresponding to the secreted form of Bhalternin. However, in ELISA it was observed levels of expression in yeast system. Still, the coagulation test was carried out and, although a bacterial sample obtained by treating the lysate precipitate with 3 M urea showed activity, the result was inconclusive, since a sample obtained with the control clone (transformed with the vector) also showed activity. In the azocaseinolytic test, all results samples showed activity, including samples obtained with control clones. In the case of yeast expression system, the results seem to indicate low expression of Bhalternin, even though codons optimized for *P. pastoris* expression were used. On the other hand, in bacterial system, solubilization of Bhalternin with urea was necessary and the treatment may have caused changes in its activities. Therefore, further tests should be performed in order to obtain Bhalternin as soluble form and to evaluate its therapeutic potential in thrombotic disorders, as well as, its antiviral, antibacterial, and antiparasitic activities.

### Keywords

Snake venom, Recombinant Bhalternin, Serine protease, Expression systems

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura tridimensional (3D) da enzima Balternina (P0CG03) gerada pela técnica baseada em homologia.....	4
<b>Figura 2</b> - Esquemas do mapa físico dos vetores pGS-21a e pPICZ $\alpha$ A.....	9
<b>Figura 3</b> - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR realizada com colônias obtidas por eletroporação com a reação de ligação do vetor (pGS-21a) e o fragmento contendo a sequência codificante da Balternina.....	17
<b>Figura 4</b> - Mapa parcial do pGSBH2 construído.....	18
<b>Figura 5</b> - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com colônias de BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL transformadas com pGSBH2.....	18
<b>Figura 6</b> - Triagem da expressão bacteriana.....	19
<b>Figura 7</b> - SDS-PAGE da expressão bacteriana da Balternina.....	20
<b>Figura 8</b> - <i>Western blotting</i> da expressão da Balternina em bactérias.....	20
<b>Figura 9</b> - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com colônias transformadas.....	22
<b>Figura 10</b> - Estrutura parcial do pP $\alpha$ ABH9 construído.....	22
<b>Figura 11</b> - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com amostras das colônias de <i>P. pastoris</i> .....	23
<b>Figura 12</b> - SDS-PAGE da expressão da Balternina em levedura.....	24
<b>Figura 13</b> - <i>Western blotting</i> da expressão da Balternina em levedura.....	25

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Composição da peçonha das serpentes da família Viperidae.....	2
<b>Gráfico 2</b> - Perfil proteômico da peçonha de <i>Bothrops alternatus</i> .....	2
<b>Gráfico 3</b> - Análise da expressão bacteriana da Balternina por ELISA.....	21
<b>Gráfico 4</b> - Análise da expressão da Balternina em levedura por ELISA.....	26

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Atividade de coagulação.....	27
--	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Peçonhas de serpentes.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Serinoproteases.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Balternina.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Propriedades terapêuticas das peçonhas.....</b>	<b>4</b>
<b>1.5 Expressão de proteínas em sistema bacteriano e de levedura.....</b>	<b>6</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>7</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>8</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
<b>4.1 Construção dos plasmídeos contendo a sequência codificante da Balternina madura.....</b>	<b>8</b>
<b>4.2 Expressão da Balternina em sistema bacteriano.....</b>	<b>10</b>
<b>4.3 Expressão da Balternina em levedura.....</b>	<b>12</b>
<b>4.3.1 Transformação.....</b>	<b>12</b>
<b>4.3.2 Purificação das colônias.....</b>	<b>14</b>
<b>4.3.3 Expressão da Balternina em <i>P. pastoris</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>4.4 Eletroforese em dodecil sulfato de sódio – gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)...</b>	<b>14</b>
<b>4.5 <i>Western blotting</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>4.6 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).....</b>	<b>15</b>
<b>4.7 Avaliação das atividades enzimáticas.....</b>	<b>16</b>
<b>4.7.1 Atividade azocaseínolítica.....</b>	<b>16</b>
<b>4.7.2 Avaliação da atividade de coagulação.....</b>	<b>16</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>5.1 Clonagem e expressão da Balternina em bactéria.....</b>	<b>17</b>
<b>5.2 Clonagem e expressão da Balternina em levedura.....</b>	<b>21</b>

<b>5.3 Testes enzimáticos.....</b>	<b>26</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>28</b>

# 1 INTRODUÇÃO

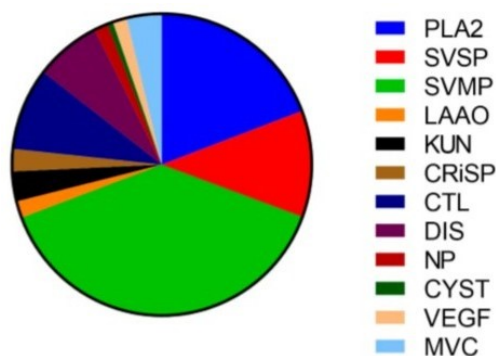
## 1.1 Peçonhas de serpentes

O grupo dos animais peçonhentos é constituído por animais que possuem a característica de produzir peçonha e conseguir armazená-lo em estruturas especializadas para inoculação em presas ou predadores. No mundo existem diversas espécies peçonhentas e, no Brasil, esses animais compreendem, principalmente, os escorpiões (gênero *Tityus*), as serpentes (gênero *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Micrurus*) e aranhas (gênero *Phoneutria*, *Loxosceles*, *Latrodectus*), sendo responsáveis por um grande número de acidentes, que podem até mesmo ser fatais (SILVEIRA *et al.*, 2017).

No Brasil, os acidentes ofídicos que mais ocorrem são os acidentes botrópicos. Uma das principais espécies responsáveis por esses acidentes é a *Bothrops alternatus*, que são serpentes pertencentes à família Viperidae, e que são comumente observadas nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (BRASIL, 2018). O envenenamento por esta produz extensos efeitos locais, que incluem dor, edema, inflamação, hemorragia e necrose; e também efeitos sistêmicos, como a coagulopatia, hemorragia interna e insuficiência renal aguda (CARDOSO *et al.*, 2010).

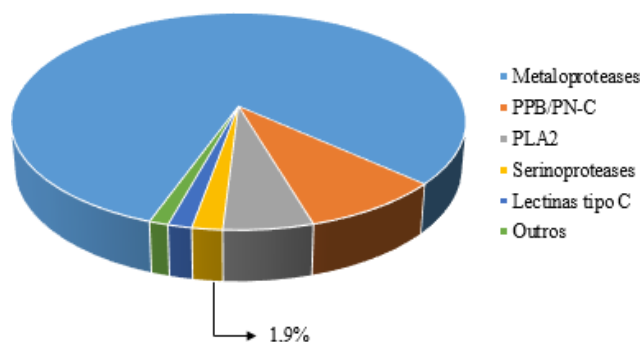
As peçonhas são constituídas por uma mistura de proteínas, com atividade enzimática e não enzimática, além de componentes orgânicos (carboidratos, nucleotídeos, aminos, lipídeos e aminoácidos) e inorgânicos (diferentes íons, como cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio e zinco) (GOMES, 2013; MATIAS *et al.*, 2017).

A quantidade e a qualidade de cada componente presente nas peçonhas variam de acordo com a família que a serpente pertence. As serpentes da família Viperidae, apresentam em sua composição fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), serinoproteases (SVSP), metaloproteases (SVMP), L-aminoácido oxidases (LAAO), peptídeo Kunitz (KUN), proteínas secretórias ricas em cisteína (CRiSP), lectinas tipo C (CTL), desintegrinas (DIS), peptídeos natriuréticos (NP), fator de crescimento de nervo (NGF), cistatina (CYS), e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Dentre essas proteínas, três classes estão presentes em maior quantidade, que são as metaloproteases, fosfolipases A<sub>2</sub>, e serinoproteases (Gráfico 1) (TASOULIS *et al.*, 2017).



**Gráfico 1: Composição da peçonha das serpentes da família Viperidae.** Fonte: Tasoulis *et al.*, 2017.

Particularmente, a peçonha da *Bothrops alternatus* é constituída principalmente de metaloproteases, desintegrinas, fosfolipase A<sub>2</sub>, serinoproteases, lectinas tipo C, proteínas secretórias, fatores de crescimento, hialuronidasas, dentre outros componentes (Gráfico 2) (CARDOSO *et al.*, 2010).



**Gráfico 2: Perfil proteômico da peçonha de *Bothrops alternatus*.** Abreviações: PPB: peptídeos potenciadores de bradicinina; PN-C: peptídeos natriuréticos do tipo C; PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>. Fonte: adaptado de Paschoal, 2015.

A ação conjunta destas toxinas pode exercer intoxicação, produzindo efeitos locais (dor, inchaço, linfadenopatia regional, equimose) e sistêmicos (hemorragia sistêmica, desordem de coagulação, choque cardiovascular, e falência renal aguda), que afetam o sistema fisiológico de um indivíduo. Em alguns casos, infecções bacterianas secundárias também são observadas (DA SILVA SOUZA *et al.*, 2018).

Entretanto, ao avaliar a ação individual de cada uma destas toxinas, alguns estudos, como o realizado por Muller *et al.* (2014), mostraram que estas podem se apresentar como potenciais agentes terapêuticos para doenças humanas, como por exemplo, as doenças virais. Além disso, podem atuar na manutenção e funcionamento de funções biológicas, como homeostase, agregação plaquetária e digestão de lipídeos (FERNANDES DE OLIVEIRA *et al.*, 2013).



## 1.2 Serinoproteases

As serinoproteases são endopeptidases que pertencem a uma família de enzimas que compõem o grupo das hidrolases (ZANPHORLIN, 2010). Acredita-se que as serinoproteases surgiram como enzimas digestivas, que após sofrerem modificações, passaram a desempenhar outras funções, como o que é observado nas serinoproteases encontradas na peçonha da serpente *Bothrops alternatus*, que possuem ação semelhante às enzimas envolvidas na coagulação sanguínea (FERNANDES DE OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Estruturalmente, são glicoproteínas (apresentam sítio de glicosilação) de cadeia única que possuem uma região catalítica altamente conservada constituída de serina, associada a resíduos de histidina e aspartato. Além disso, possuem também resíduos de cisteína, que são responsáveis pela formação das pontes dissulfeto. Apesar de serem glicoproteínas de cadeia única, interagem com uma grande diversidade de substratos, e possuem uma massa molecular que varia entre 26 e 67 kDa (MAMEDE, 2015; AMORIM *et al.*, 2018).

As serinoproteases são sintetizadas como zimogênios e desempenham um papel importante na atividade patofisiológica induzida pela peçonha, pelo fato de estarem envolvidas em desordens hemostáticas, como ter influência na agregação plaquetária, no sistema fibrinolítico, na pressão sanguínea, além de poderem modular a angiogênese (AMORIM *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2018). Ainda apresentam ação anticoagulante, pois podem ou realizar a degradação proteolítica de componentes do sistema hemostático, ou ativar e inibir de forma específica fatores da coagulação e fibrinólise. Possuem também a característica de degradar preferencialmente a cadeia B $\beta$  do fibrinogênio (PASCHOAL, 2015; BHAT *et al.*, 2016).

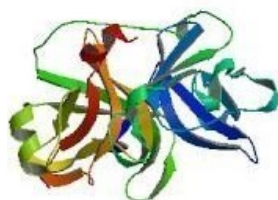
As serinoproteases são a quarta classe de proteínas mais abundantes nas peçonhas da serpente *Bothrops alternatus*, estando relacionadas a dores locais, vasodilatação e hipotensão sistêmica (CARDOSO *et al.*, 2010; PASCHOAL, 2015). Um exemplo de serinoprotease encontrada na peçonha de *Bothrops alternatus* é a Bhalternina (COSTA *et al.*, 2010).

## 1.3 Bhalternina

A Bhalternina é uma serinoprotease que foi descrita no trabalho realizado por Costa *et al.* (2010). De acordo com estes pesquisadores e também com a plataforma Uniprot (2017), esta enzima possui ação semelhante a trombina, representando cerca de 1,9% do peso bruto da

peçonha. É constituída por uma cadeia polipeptídica única, e induz coagulação *in vitro*, desfibrinogenação *in vivo*, hemólise, hiperemia, necrose, miotoxicidade, mionecrose, além de possuir atividade albuminolítica e fibrinogenolítica.

Além disso, apesar de a maioria das serinoproteases degradarem preferencialmente a cadeia B $\beta$  do fibrinogênio, esta, por sua vez, degrada a cadeia A $\alpha$ , sendo considerada como uma alfa-fibrinogenase (PASCHOAL, 2015). Sua estrutura tridimensional foi determinada a partir de sua purificação e pode ser observada na figura 1 a seguir.



**Figura 1: Estrutura tridimensional (3D) da enzima Bhalterina (P0CG03) gerada pela técnica baseada em homologia.** Fonte: [https://www.proteinmodelportal.org/?pid=modelDetail&provider=SWISSMODEL&template=1op2.&pmpuid=1001078405375&range\\_from=1&range\\_to=260&ref\\_ac=P0CG03&mapped\\_ac=P0CG03&zid=async](https://www.proteinmodelportal.org/?pid=modelDetail&provider=SWISSMODEL&template=1op2.&pmpuid=1001078405375&range_from=1&range_to=260&ref_ac=P0CG03&mapped_ac=P0CG03&zid=async).

No entanto, a baixa quantidade da Bhalterina obtida da peçonha e a complexidade envolvida na sua purificação dificultam a realização de estudos para a avaliação mais aprofundada de seu potencial como agente terapêutico.

#### 1.4 Propriedades Terapêuticas das Peçonhas

Como abordado anteriormente, as peçonhas são uma mistura de diversos compostos bioativos e tem se tornado importantes alvos de muitos estudos, pelo fato de possuírem uma variedade de propriedades bioquímicas, funcionais e estruturais que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de fármacos, principalmente as das serpentes da família Viperidae (MULLER, 2011; CANHAS *et al.*, 2017).

Já foram descritos diversos estudos que avaliam o potencial terapêutico das peçonhas, e nestes foi demonstrado que algumas das toxinas que compõem esta mistura possuem ação antiviral contra os vírus da dengue e da febre amarela, agindo sob uma proteína do envelope destes (MULLER *et al.*, 2014). Além disso, já foi observado também que, uma L-aminoácido oxidase denominada BjarLAAO-I isolada de *Bothrops jararaca*, reduz a carga viral em células infectadas com o vírus da dengue sorotipo 3, pelo fato de estas flavoenzimas também produzirem o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como radical livre (DA MATA *et al.*, 2017).

Ainda de acordo com Da Mata *et al.* (2017), as peçonhas de serpentes estão sendo consideradas fortes candidatas para novas drogas antivirais, como por exemplo, sendo uma forma de complementação da terapia antirretroviral, que demonstrou uma diminuição da carga viral, bem como um aumento de células T CD4+, pelo fato de determinadas moléculas das peçonhas possuírem características semelhantes às glicoproteínas ou proteases do vírus da imunodeficiência humana sorotipo 1 (HIV-I).

Além de atividade antiviral, alguns estudos já demonstraram também que alguns componentes presentes nas peçonhas de serpentes possuem ação antimicrobiana, agindo contra bactérias gram-negativas fermentadoras e não fermentadoras de glicose (QUEIROZ, 2010), inibindo em maior escala o crescimento de bactérias gram-negativas do que gram-positivas (MACEDO, 2011), e apresentando potencial bactericida em *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e suas formações de biofilmes (CANHAS *et al.*, 2017).

De acordo com Rosas (2013), podem apresentar ação antiparasitária contra *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*, o que também já foi observado no estudo realizado por Queiroz (2010), que demonstrou atividade antiparasitária *in vitro* da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* contra *Leishmania* spp., devido a ação de uma L-aminoácido oxidase que forma peróxido de hidrogênio. Já foi evidenciado também uma fosfolipase A<sub>2</sub> denominada BnSP-6, proveniente da serpente *Bothrops pauloensis*, que induziu atividade citotóxica contra larvas infectantes de *Strongyloides venezuelensis* (*S. venezuelensis*), apresentando uma eficácia mais elevada que a ivermectina, que é o atual fármaco de escolha para o tratamento desta helmintíase, por não apresentar toxicidade para as células intestinais (RODRIGUES, 2017).

Outrossim, também estão envolvidas com o sistema hemostático. Atualmente, já existem drogas que são utilizadas para o tratamento de hipertensão, como por exemplo, o Captopril, que é um peptídeo isolado da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*, que possui a capacidade de inibir a enzima conversora de angiotensina (CROW, 2012), bem como o Batroxobin, que é uma serinoprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops atrox*, que possui ação sob a agregação plaquetária e formação de coágulos de fibrina (VU *et al.*, 2013).

Além dessas propriedades, as peçonhas podem atuar como ferramenta farmacológica seletiva para o receptor nicotínico de acetilcolina (UTKIN, 2015), interferem no sistema hemostático gerando trombólise, o que pode ser útil para o desenvolvimento de fármacos para tratamento de diversas doenças humanas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016), possui eficiência na liberação de citocinas pró-inflamatórias (DIAS *et al.*, 2018), bem como podem exercer

atividade antitumoral com ação citotóxica e inibição da adesão celular em células de tumor de mama, por estimular autofagia e apoptose (RODRIGUES, 2017).

O desenvolvimento de novos agentes antiparasitários, antivirais e antimicrobianos é de suma importância, pois proporcionará o descobrimento de novas terapias, que possam ser menos tóxicas, como o que foi observado por Rodrigues (2017), ao ver que a fosfolipase BnSp-6 possui uma eficácia 12 vezes maior que a ivermectina para o tratamento de Strongilodíase humana e, além disso, não é tóxica para as células intestinais; novas terapias que possam complementar tratamentos pré-existentes, como o que foi descrito por Mata *et al.* (2017), ao observar que ao associar a peçonha de serpente ao tratamento antirretroviral, houve uma redução da carga viral e um aumento de células T CD4+; ou também substituir antibióticos que alguns micro-organismos já adquiriram resistência, visto que já foi observado por Bustillo *et al.* (2008), que a peçonha da serpente *Bothrops alternatus* possui ação bactericida contra *E. coli* e *S. aureus*, além de possuir ação bactericida intermediária para bactérias que possuem um caráter maior de resistência como *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*.

### **1.5 Expressão de proteínas em sistema bacteriano e de levedura**

Alguns animais e microrganismos produzem substâncias, como enzimas e proteínas, que são de grande interesse farmacológico, porém em quantidades limitadas. Tendo em vista este fato, alguns pesquisadores começaram a empregar a expressão dessas moléculas em sistemas de cultura celular para que pudessem obter estes produtos de interesse em quantidades maiores. Atualmente, existem tanto a expressão em organismo procariotos, que utiliza comumente a *Escherichia coli* (*E. coli*), quanto para eucariotos, que pode ser realizada em células de leveduras, plantas, de insetos ou mesmo de mamíferos (CARMO, 2010).

Dentre os sistemas de expressão procariótica, o que utiliza a *E. coli* é o mais utilizado, por ser de fácil manipulação, de baixo custo, alta reprodutibilidade e alta quantidade de proteínas de interesse que são geradas. Além disso, este sistema permite que sejam realizadas algumas mudanças, tanto no próprio organismo como nas condições de cultivo, que consequentemente aumentam tanto a versatilidade quanto eficiência deste (POROWINSKA *et al.*, 2013). Um exemplo de expressão de DNA recombinante em *E. coli* que foi descoberto a

algum tempo, foi a insulina recombinante, que já foi utilizada em seres humanos desde 1980 em um estudo realizado por Keen *et al.* (1980).

Já os sistemas de expressão eucariótica, além de possuírem algumas das mesmas vantagens que a expressão procariótica, também possuem as características de realizar modificações pós-traducionais nas proteínas e, no caso da levedura, de apresentarem altos níveis de expressão. Este sistema se mostra específico não apenas para expressar genes, mas também na possibilidade da secreção das proteínas de interesse (KIM *et al.*, 2015).

A *Pichia pastoris* é uma levedura que possui a característica de ser metilotrófica, ou seja, é capaz de se multiplicar em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono. Esta levedura foi geneticamente produzida para produzir centenas de proteínas recombinantes com importância industrial e farmacêutica. Por isso, é um dos micro-organismos mais utilizados para realizar a expressão eucariótica (LIN-CEREGHINO *et al.*, 2013; AHMAD *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2019).

Além disso, é bastante empregada por ser de fácil manipulação; possuir boa multiplicação celular; ser capaz de promover modificações pós-traducionais, como formação de pontes dissulfeto e O- e N- glicosilação; não induzir fermentação; secretar poucas proteínas endógenas; além de expressar altos níveis de proteínas tanto direcionado para o meio intracelular como extracelular (RUBINI, 2009; LIN-CEREGHINO *et al.*, 2013).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Clonar, expressar e avaliar a atividade enzimática da Balternina, uma serinoprotease da serpente *Bothrops alternatus*, em sistema de expressão bacteriano e de levedura.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Construir o plasmídeo contendo a sequência codificante da Balternina em vetor para a expressão em bactéria e levedura.
- Introduzir o DNA plasmidial construído, por eletroporação, em *E. coli* cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL e em *Pichia pastoris* cepa X-33.

- Avaliar a presença dos plasmídeos nas colônias obtidas com o cultivo das células eletroporadas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).
- Purificar clones das colônias que se apresentarem positivas por meio de PCR.
- Realizar a expressão da proteína e avaliação por meio de eletroforese, *Western Blotting* e ELISA.
- Avaliar atividades enzimáticas da Balternina recombinante.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Recentemente, muitos estudos têm sido realizados para avaliar o potencial terapêutico de diversos produtos naturais. Dentre estes produtos, temos as peçonhas, que por possuírem uma série de componentes proteicos, como metaloproteases e serinoproteases, podem servir como grandes recursos para o desenvolvimento de medicamentos, não só para o tratamento de coagulopatias, como também para o tratamento de infecções virais, microbianas, parasitárias (ROSAS, 2013; MULLER *et al.*, 2014).

O presente estudo tem como objetivo principal obter a Balternina, uma serinoprotease da peçonha de *Bothrops alternatus*, na forma recombinante. A enzima isolada da peçonha da serpente apresentou atividade fibrinogenolítica, que é de interesse farmacológico como potencial agente terapêutico no tratamento e prevenção de doenças trombóticas (COSTA *et al.*, 2010).

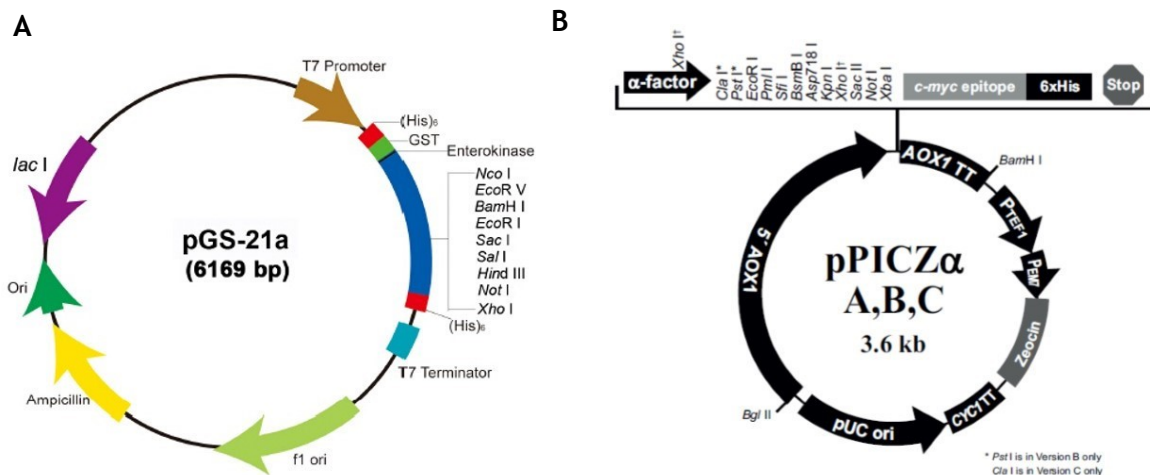
No entanto, além da limitação na obtenção da peçonha, a baixa quantidade da Bhalternina e a dificuldade envolvida na sua purificação dificultam a realização de estudos mais aprofundados de seu potencial terapêutico. Assim, a obtenção da Balternina recombinante será essencial para realização desses estudos. Além do potencial uso em coagulopatias, permitirá também, em etapas futuras, realizar sua avaliação como agente antiparasitário, antibacteriano e antiviral.

### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Construção dos plasmídeos contendo a sequência codificante da Balternina madura**

A sequência codificante da Balternina madura (COSTA *et al.*, 2010) foi sintetizada pela empresa GenScript (GenScript, Piscataway, NJ, EUA) e clonada no plasmídeo PICBH1. O clone bacteriano contendo o plasmídeo foi cultivado em meio 2xYT (triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 0,5%), contendo ampicilina a 100 µg/mL, e incubado à 37°C *overnight* (O/N). 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 Balternina.

O DNA de pGS-21a (GenScript – Figura 2A), o vetor de expressão em sistema bacteriano que foi utilizado para inserção do segmento codificante da Balternina, foi purificado e também digerido com as enzimas *Eco* RI e *Not* I para inserção do fragmento de interesse. Da mesma forma, DNA de pPICZα A (Thermo Fisher/Invitrogen, Waltham – MA, EUA – Figura 2B) foi purificado e digerido com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Not* I.



**Figura 2: Esquemas do mapa físico dos vetores pGS-21a e pPICZα A.** (A) O esquema apresenta a região de múltipla clonagem com os sítios de restrição que compõem o plasmídeo. (B) A figura resume as características dos vetores pPICZα A, B e C, apresentando a região de múltipla clonagem com os sítios de restrição que compõem o vetor. Fonte: adaptado de LIFE TECHNOLOGIES/ INVITROGEN (2010) e GenScript (2016).

Os DNAs dos vetores pGS-21a e pPICZα A digeridos e o segmento codificante da Balternina (BH1) foram submetidos a reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher/Fermentas). A sequência codificante da BH1 foi otimizada para expressão em *Pichia pastoris* (GenScript) sendo que na extremidade 5' foi inserido sítio para *Eco* RI,

seguido da sequência codificante para a cauda de polihistidina (6xHis) e o segmento DDDDK, para enteroquinase. Na extremidade 3', foi inserido um *stop codon* e o sítio *Not I*.

Uma alíquota da reação de ligação foi utilizada na transformação da bactéria *E. coli*, cepa TOP10, por eletroporação com MicroPulser electroporator BioRad (Hercules, Santo Amaro – SP, Brasil), conforme instruções do fabricante. Após a eletroporação, as células foram cultivadas em placas com meio de cultura LB (extrato de levedura 1%, tripton 0,5%, NaCl 1%, ágar 2%) contendo ampicilina 100 µg/mL, para a clonagem em pGS-21a, e zeocina 25 µg/mL, para clonagem em pPICZα A, para obtenção de colônias transformantes.

Algumas colônias foram selecionadas e submetidas à PCR para confirmar a presença do gene codificante da Balternina. A mistura de reação (Tampão completo II KCl 1x Bioron, dNTPs 0,2 mM, *primer* T7 promoter (TAATACGACTCACTATAGGG) 0,3 µM, *primer* BH187RV (CGTCTTCATTGGTGACGTTCTTA) 0,3 µM, 1 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água para biologia molecular para volume final de 20 µL) foi distribuída em tubos de PCR, células das colônias coletadas na ponta da ponteira foram inoculadas em seus respectivos tubos e a amplificação foi realizada seguindo as seguintes condições: desnaturação à 94 °C por 10 min; 35 ciclos de desnaturação à 94 °C por 30 s, anelamento à 45° C por 30 s e extensão à 72° C por 1,5 min; por último, extensão à 72° C por 7 min.

Após a 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 (QIAGEN) e submetida ao sequenciamento nucleotídico com os *primers* PGEXFR (TGCAGGGCTGGCAAGCCACG) e E2RVNOT1 (CGCGCGCCGCTTGTAGCAGCCGGATCTCA), utilizando BigDye terminator 3.1. Os plasmídeos obtidos foram nomeados pGSBH2, para expressão bacteriana, e pPαABH9, para expressão em leveduras.

#### **4.2 Expressão da Balternina em sistema bacteriano**

Os DNAs de pGSBH2 e pGS-21a (vetor, usado como controle) foram utilizados na transformação de *E. coli*, cepa BL21-*CodonPlus* (DE3)-RIPL (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) por eletroporação. As células foram cultivadas em placas 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 Balternina nesses clones por meio de PCR com os *primers* PGEXFR e E2RVNOT1.



Dez colônias selecionadas foram submetidas à 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 1 mL de meio 2xYT contendo ampicilina 100 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL à 37 °C O/N em *shaker*. Como controle, foi utilizado o clone BL21(DE3) A o qual possui o vetor pGS-21a. No dia seguinte, 100 µL dessas culturas foram inoculadas em 1 mL 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, sendo a cultura incubada por 3 h à 37 °C em *shaker*.

Após o término do período de indução, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado, o *pellet* foi ressuspensão com 50 µL de água Milli-Q e misturado com 50 µL de 2x Stop Solution (azul de bromofenol 0,4%, Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, glicerol 40%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5%). Após incubação a 95 °C por 10 min, as amostras foram submetidas à eletroforese em dodecil sulfato de sódio - gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Dois clones, assim como os clones controles (com pGS-21a e sem o vetor), foram selecionados para expressão em volume de cultura maior. Para isso, os clones foram inoculados em 4 mL de meio 2xYT contendo ampicilina 100 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL e incubados à 37 °C O/N em *shaker*. No dia seguinte, a suspensão foi inoculada em 40 mL de meio 2xYT sem antibióticos, seguindo-se de incubação por 3 h à 26 °C em *shaker*. Em seguida, IPTG foi adicionado para concentração final de 0,1 ou 0,9 mM para induzir a expressão da proteína, a cultura foi incubada por 3 h à 26 °C em *shaker* e após esse período as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o *pellet* dos clones armazenado a -20°C.

Os *pellets* foram ressuspensos com 200 µL de tampão TN (Tris-HCl 45 mM, NaCl 0,07 M, pH 8,0) 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, 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 MgCl<sub>2</sub> 25 mM, e as misturas foram incubadas à temperatura ambiente durante 30 min.

Os lisados foram centrifugados a 15000 x g 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, *Western blotting* e ELISA.

### 4.3 Expressão em Levedura

#### 4.3.1 Transformação

Cerca de 85 µg de cada DNA, de pPαABH9 e de pPICZα A (vetor, usado como controle), foram linearizados com a enzima *Sac* I e avaliados por eletroforese em gel de agarose 1%. A linearização é importante para que o DNA plasmidial seja integrado ao DNA genômico da levedura tornando-a estável. Após a reação, foi adicionado o mesmo volume de fenol/clorofórmio (v:v), a amostra foi agitada em vórtex por 30 s e centrifugada a 11000 x g por 15 min. A parte aquosa foi transferida para um tubo de 1,5 mL e adicionou-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M e 0,7 volume de isopropanol. Depois, o tubo foi agitado por inversão aproximadamente 20 vezes e incubado à -20 °C por 30 min. Feito isso, a amostra foi centrifugada a 17000 x g por 15 min à 4 °C e o sobrenadante descartado. Posteriormente, próximo ao fogo, adicionou-se 500 µL de etanol 70% à amostra, que foi agitada por inversão e centrifugada a 11000 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram adicionados 10 µL de água Milli-Q autoclavada. Por último, a amostra foi incubada O/N à 4 °C para hidratar o DNA e facilitar sua dissolução.

A preparação da *Pichia pastoris* para eletroporação foi realizada de acordo com o manual do *kit EasySelect™ Pichia Expression* (LIFE TECHNOLOGIES/INVITROGEN, 2010). Primeiramente, uma alíquota do estoque da levedura foi inoculada em 1,0 mL de meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%), que ficou incubado O/N sob agitação à 30 °C. Em seguida, inoculou-se um volume de 50 µL da cultura em 100 mL de YPD e este foi incubado novamente sob agitação à 30 °C até atingir OD<sub>600</sub> = 1,3-1,5. Ao atingir a OD<sub>600</sub> desejada, o frasco foi colocado imediatamente em gelo, o volume foi transferido para tubos cônicos de 50 mL e posteriormente a amostra foi centrifugada a 1500 x g por 5 min à 4 °C. O precipitado foi ressuspensionado com 85 mL de água Milli-Q estéril e submetido à nova centrifugação. Após isso, ainda em gelo, o precipitado foi ressuspensionado com 3,3 mL de sorbitol 1 M estéril e novamente centrifugado. As células foram

ressuspendidas mais uma vez, com 170  $\mu$ L de sorbitol 1 M estéril, e permaneceram em gelo até a eletroporação.

Um total de 80  $\mu$ L das células competentes de *Pichia pastoris* foram misturados com 5  $\mu$ g de DNA linearizado. Essa mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm e incubada por 5 min em gelo. Após isso, a cubeta foi colocada em um eletroporador MicroPulser electroporator BioRad e o pulso foi dado a uma voltagem de 2300 V. Em seguida, adicionou-se 1 mL de sorbitol 1 M na cubeta, o volume foi transferido para um tubo e incubado por 2 h à 30 °C. Cerca de 200  $\mu$ L da amostra foram espalhados em uma placa contendo o meio YPDS (YPD contendo sorbitol 1 M e ágar 2%) contendo zeocina 100  $\mu$ g/mL, e esta foi incubada à 30 °C por 3-10 dias. As colônias obtidas foram submetidas à avaliação da presença do DNA plasmidial utilizado na eletroporação e ao processo de purificação dos clones.

A PCR foi realizada para determinar se os plasmídeos estavam presentes nas colônias obtidas após a eletroporação e seguiu o manual do *kit EasySelect™ Pichia Expression*. Foi possível a realização de dois tipos de PCR: a primeiro sendo feita diretamente com células da colônia da placa de eletroporação e a segunda sendo realizada com o DNA extraído dessas colônias. A PCR foi realizada como descrita acima, porém com *primers*  $\alpha$ -factor (TACTATTGCCAGCATTGCTGC) e 3'AOX (GCAAATGGCATTCTGACATCC) (Thermo Fisher/Invitrogen). Para a PCR feita com as células coletadas da colônia, o volume da reação foi coberto com 20  $\mu$ L de óleo mineral. Após isso, os tubos foram submetidos às seguintes condições: 94 °C por 10 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 45 °C por 30 s, 72 °C por 1 min; e 72 °C por 7 min. Uma alíquota de 10  $\mu$ L de cada produto de PCR foi analisada em eletroforese de gel de agarose a 1%, como já foi descrito anteriormente.

Para a PCR feita com DNA extraído das colônias obtidas após a eletroporação, cada colônia selecionada foi inoculada em 1 mL de meio YPD contendo zeocina 100  $\mu$ g/mL e incubada por 3 dias à 30 °C. Em seguida, a cultura foi transferida para um microtubo e centrifugada por 5 min à 14000 x g. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuspendido com 50  $\mu$ L de fenol tratado com Tris-HCl pH 8,0 e agitado em vórtex, seguido de incubação à temperatura ambiente por 2 min. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ L de TE modificado (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM pH 8.0) e 50  $\mu$ L clorofórmio. A amostra foi agitada em vórtex por 30 s e depois centrifugada à 14000 x g por 10 min. A fase aquosa obtida foi transferida para novo microtubo de 1.5 mL, o DNA foi precipitado, lavado com etanol 70%, conforme descritos acima, ressuspendido com 500  $\mu$ L de TE modificado contendo RNase A 5

µg/mL e a amostra foi incubada por 15 min à 65 °C. O volume da mistura da PCR foi ajustado para 19 µL/tubo, com adição de 1 µL do DNA de cada colônia selecionada em seus respectivos tubos.

#### **4.3.2 Purificação dos clones**

As colônias selecionadas, que apresentaram amplificação do DNA utilizado na eletroporação, foram estriadas em novas placas contendo YPDS e zeocina 100 µg/mL e as novas colônias foram avaliadas por PCR como descrito anteriormente. Foram realizadas duas etapas de purificação para obtenção do clone e, ao final, foi realizado um estoque de cada clone contendo 800 µL da cultura e 200 µL de glicerol, que foi armazenado a -80 °C.

#### **4.3.3 Expressão da Balthernina em *P. pastoris***

A expressão da proteína foi realizada adaptando-se o protocolo descrito no manual do *kit EasySelect™ Pichia Expression*. Cerca de 10 µL do estoque de cada clone foram inoculados em 100 mL de BMGY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100 mM pH 6.0, YNB 1,34%, glicerol 1%) e o inóculo foi incubado sob agitação à 26 °C por 3 dias. A cultura foi centrifugada à 3800 xg por 3 min à temperatura ambiente, e o *pellet* foi ressuspensionado em 100 mL de meio BMMY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100 mM pH 6.0, YNB 1.34%, biotina 4.0 x 10<sup>-5</sup>% e metanol 0.5%) e a suspensão foi incubada novamente à 26 °C. Metanol foi adicionado para concentração final de 1% a cada 24 h no período de 144h de incubação. Após isso, a amostra foi centrifugada à 3800 xg por 3 min à temperatura ambiente. O *pellet* foi reservado, e o sobrenadante analisado por SDS-PAGE, *Western blotting* e ELISA. A quantificação proteica foi realizada por meio de Bradford (AMRESCO, LLC Corporate Headquarters, Solon, OH, EUA).

#### **4.4 Eletroforese em dodecil sulfato de sódio – gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida (SAMBROOK; RUSSELL, 2001), que consistiu em gel de empilhamento a 5% e gel de separação a 12%, para expressão da Balthernina fusionada com glutathione-S-transferase (GST), e de separação a 16% para expressão em levedura. Para preparação das amostras, tampão Laemmli modificado foi

adicionado (para concentração final de Tris-HCl pH 6,8 62,5 mM, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,05% e  $\beta$ -mercaptoetanol 0,5%), as misturas foram incubadas à 95 °C por 10 min e submetidas à eletroforese. O gel foi corado tanto com Coomassie Blue R-250 0,2% (m/v) em 50% metanol/10% ácido acético (v/v) e também com Pierce Color Silver Stain Kit (Pierce Biotechnology/Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA), seguindo as instruções do fabricante, porém com o tempo de incubação de 5 min e metade do volume recomendado de reagente no último passo.

#### **4.5 Western blotting**

A análise da expressão por *Western blotting* seguiu as instruções do fornecedor da membrana de PVDF (Amersham Hybond-P, GE Healthcare. Chicago, IL, EUA). Após a transferência, a membrana foi removida, lavada rapidamente com tampão fosfato salino (PBS) e seca à temperatura ambiente. Para a imunodeteção, a membrana foi umedecida em metanol, lavada duas vezes por 5 min em água destilada e incubada com 0,5 mL/cm<sup>2</sup> de tampão de bloqueio (leite desnatado em pó 5% (m/v) e Tween 20 0,1% (v/v) em PBS) por 1 h à 37 °C. Após isso, a membrana foi lavada duas vezes com PBS/Tween 20 0.1% (PBS-T) e incubada por 1 h à 37 °C com 0,5 mL/cm<sup>2</sup> de 1  $\mu$ g/mL de anticorpo monoclonal anti-6xHis (mAb) (MA1135. Thermo Fisher Scientific) diluído em PBS-T. A membrana foi lavada duas vezes por 10 min com PBS-T e incubada com 0,5 mL/cm<sup>2</sup> de 0,4  $\mu$ g/mL anticorpo conjugado com peroxidase anti-mouse IgG (KPL Clopper Road. Gaithersburg, MD, EUA) diluído em PBS-T por 1 h à 37 °C. A membrana foi lavada três vezes por 10 min em PBS-T, incubada com 5 mL de DAB (3,3'-Diaminobenzina. Sigma Fast™, Saint Louis, MO, EUA. Um tablete dissolvido em 5 mL Tris-HCl 0,02 M, NaCl 0,14 M, pH 7,4, e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,072%) e a reação foi parada lavando-se a membrana com água.

#### **4.6 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)**

O teste foi realizado em placa Costar de 96 poços (Corning Inc. Corning, NY, EUA). Os poços foram sensibilizados com 50  $\mu$ L contendo 0,6  $\mu$ g da amostra proteica proveniente da expressão diluída em PBS e incubadas por 1 h à 37 °C. Após isso, os poços foram lavados uma vez com PBS/T 0.05% (PBS, Tween 20 0,05%) e bloqueados com 300 $\mu$ L PBS contendo BSA 2% por 1 h à 37 °C. Os poços foram lavados três vezes com PBS/T 0,05% e incubados

com 50 µL de mAb anti-6xHis 250 ng/mL diluído em PBS/T 0.05%/BSA 2% por 1 h à 37 °C. Em seguida, os poços foram lavados cinco vezes e incubados com 50 µL de anticorpo conjugado com peroxidase anti-mouse IgG 0,2 µg/mL (KPL) diluído em PBS/T 0.05%/BSA 2% por 1 h à 37 °C. Os poços foram lavados cinco vezes e incubados com 50 µL de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (1-Step Ultra TMB-ELISA. Pierce Biotechnology) por 30 min à temperatura ambiente. A reação foi parada com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M e a absorbância foi lida a 450 nm.

## **4.7 Avaliação das atividades enzimáticas**

### **4.7.1 Atividade azocaseinolítica**

O teste foi realizado de acordo com Costa *et al.* (2010) com modificações. Para isso, cerca de 25 µg e 50 µg de amostra proteica (levedura e bactéria, respectivamente) foram incubados separadamente com 800 µL de azocaseína 1 mg/mL (em Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0, CaCl<sub>2</sub> 4 mM) à 37 °C por 1 h e, então, foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético 15% (m/v). Após 20 min, as amostras foram centrifugadas à 10000 xg por 10 min, e a absorbância foi medida a 405 nm e uma unidade de atividade foi definida com um aumento de 0,01 unidade. Como controle positivo foi utilizada a peçonha bruta da serpente *Bothrops alternatus* (Bioagents, Batatais – SP, Brasil) diluída 1:1 (m/v), e como controle negativo PBS.

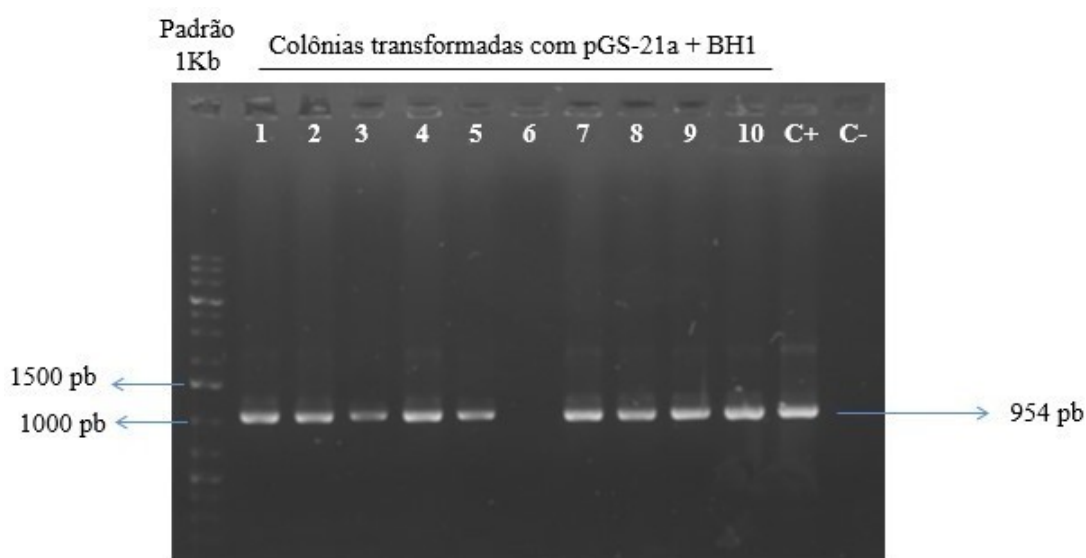
### **4.7.2 Avaliação da atividade de coagulação**

Plasma bovino foi obtido como descrito por COSTA *et al.* (2010) (Fornecido pelo Hospital Veterinário da UFU). Após isso, 25 µg e 50 µg de cada amostra proteica (de bactéria e levedura, respectivamente), em um volume ajustado para 100 µL com PBS, foram misturados separadamente com 100 µL de plasma e incubados à 37 °C por 120 s. A atividade de coagulação foi determinada utilizando CLOTimer Laser Sensor (CLOT produtos para coagulação. Sorocaba, SP). Como controle positivo foi utilizada a peçonha bruta da serpente *Bothrops alternatus* (Bioagents, Batatais – SP, Brasil) diluída 1:1 (m/v), e como controle negativo foi utilizado PBS.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Clonagem e expressão da Balternina em bactéria

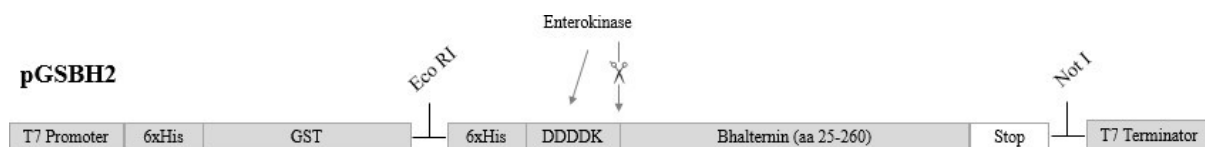
Dez colônias isoladas de *E. coli* TOP10, obtidas por eletroporação com a reação de ligação do fragmento codificante da Bhalternina com o vetor pGS-21a, foram submetidas a análise por PCR e nove apresentaram amplificação esperada de 954 pb do DNA plasmidial, indicando que houve a transformação (Figura 3).



**Figura 3: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR realizada com colônias obtidas por eletroporação com a reação de ligação do vetor (pGS-21a) e o fragmento contendo a sequência codificante da Balternina.** O gel de agarose foi realizado na concentração de 0,5% e o padrão de massa molecular utilizado foi de 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas). Os números de 1 a 10 presentes em cada raia, indicam as colônias transformadas com pGS-21a + BH1. O controle positivo (C+) usado foi a reação de ligação pGS21a+BH1 e o controle negativo (C-) usado foi a mix da PCR.

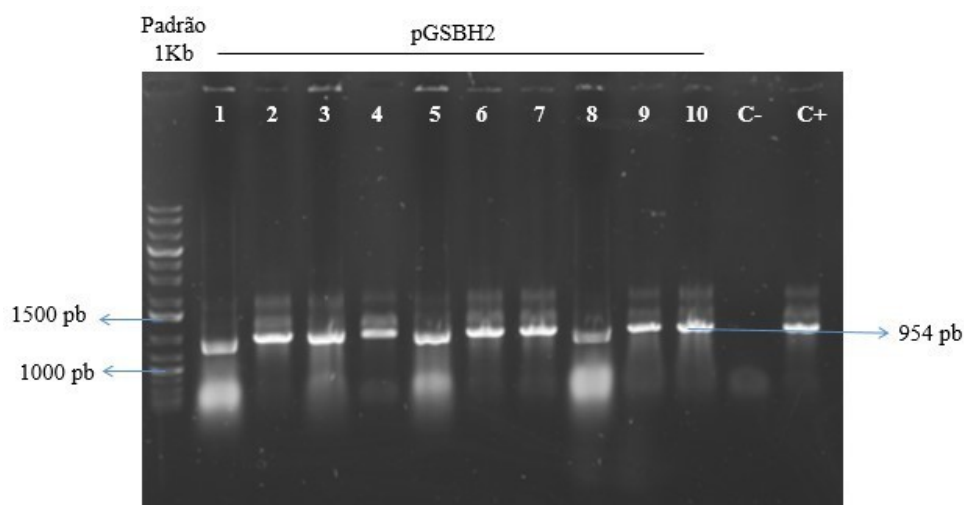
A colônia 2, denominada de clone GSBH2, foi selecionada e seu plasmídeo foi obtido para o sequenciamento nucleotídico. Além de confirmada a sequência codificante da Balternina, também foi confirmada a presença da cauda de polihistidina (6xHis) e do sítio de reconhecimento de clivagem DDDDK por enteroquinase. O mapa parcial do plasmídeo construído (pGSBH2) está representado na figura 4. 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. Essa protease reconhece e cliva após o resíduo de lisina na sequência de reconhecimento, DDDDK, sem deixar resíduos de aminoácidos nos produtos peptídicos clivados (CHOI *et al.*, 2001).



**Figura 4: Mapa parcial do pGSBH2 construído.** Segmento correspondente a Balternina madura (aa 25 a 260) foi clonado para sistema de expressão em bactéria. O esquema exhibe a cauda de 6xHis, glutationa-S-transferase (GST), sítio DDDDK de reconhecimento e clivagem por enteroquinase.

Tendo a confirmação por sequenciamento, o DNA de pGSBH2 foi utilizado na transformação de *E. coli* cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL por eletroporação. Novamente, dez colônias foram selecionadas para análise por PCR e todas as colônias apresentaram amplificação do segmento de tamanho esperado de 954 pb (Figura 5).

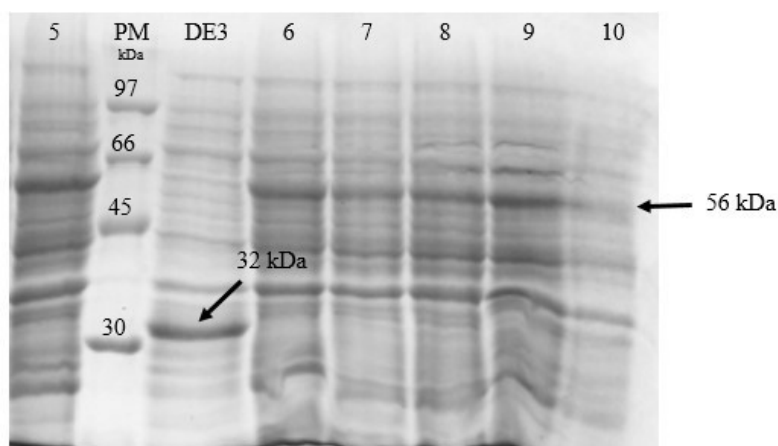


**Figura 5: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com colônias de BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL transformadas com pGSBH2.** O gel de agarose foi realizado na concentração de 0,5% e o padrão de massa molecular utilizado foi de 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas). Os número de 1 a 10 presentes nas raias indicam as colônias transformadas com pGSBH2. O controle positivo (C+) usado foi o DNA pGSBH2 e o controle negativo (C-) usado foi a mix da PCR.

Dez colônias (1 a 10) foram selecionadas para a realização da triagem da expressão por indução com IPTG. A IPTG é uma alolactose sintética, que se liga do *lac repressor*, que é expresso pelo gene *Lac I* presente no vetor, e o libera do *lac operator*, sequência presente logo após a sequência do promotor T7, promovendo a expressão da sequência presente a jusante, no caso a que codifica a GST seguida da que codifica a Balternina. Com a SDS-PAGE, foi possível observar uma banda mais intensa de aproximadamente 56 kDa, massa



molecular próxima ao esperado, com amostras de clones transformados com pGSBH2, indicando a expressão da Balternina (aproximadamente 27 kDa) fusionada com a proteína Glutathiona-S-Transferase (GST) (aproximadamente 29.4 kDa). Na amostra obtida com clone transformado apenas com o vetor (clone controle), foi observada uma banda mais intensa com aproximadamente 32 kDa, que corresponde apenas à GST (Figura 6). A massa molecular da porção GST é menor no caso da proteína GST-Balternina (em comparação com a GST expressa pelo clone controle), uma vez que parte correspondente à extremidade C-terminal na sequência codificante da GST foi perdida devido aos sítios de clonagem utilizados.

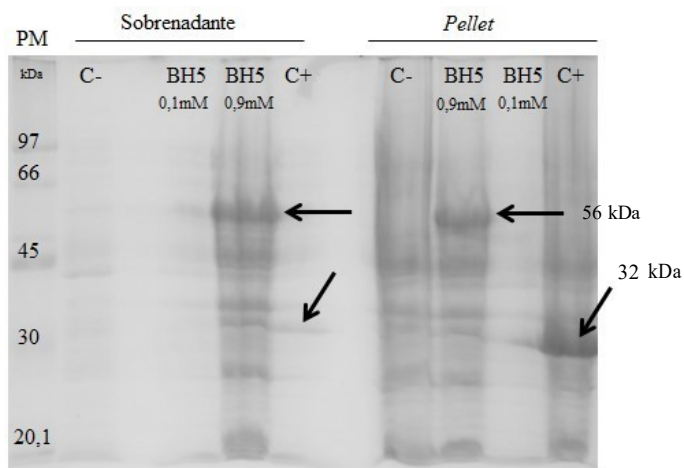


**Figura 6: Triagem da expressão bacteriana.** Análise da expressão da Balternina-GST pelos clones BLCBH5-10 (indicados pelos números 5 a 10 nas raias). As setas horizontais indicam uma banda proteica de aproximadamente 56 kDa (massa molecular esperada para Balternina fusionada a proteína GST), e as setas diagonais indicam banda proteica correspondente a proteínas GST (aproximadamente 32 kDa) expressa pelo clone transformado apenas com o vetor (clone BL21DE3A), representado pela raia DE3, que foi utilizado nesse caso como controle negativo e positivo.

A expressão em sistema bacteriano é um dos mais utilizados por ser de fácil manipulação, de baixo custo, possuir alta reprodutibilidade e permitir que altas quantidades de proteínas de interesse sejam produzidas. Além disso, esse sistema permite mudanças nas condições de crescimento que consequentemente aumentam a versatilidade e eficiência do teste (POROWINSKA *et al.*, 2013).

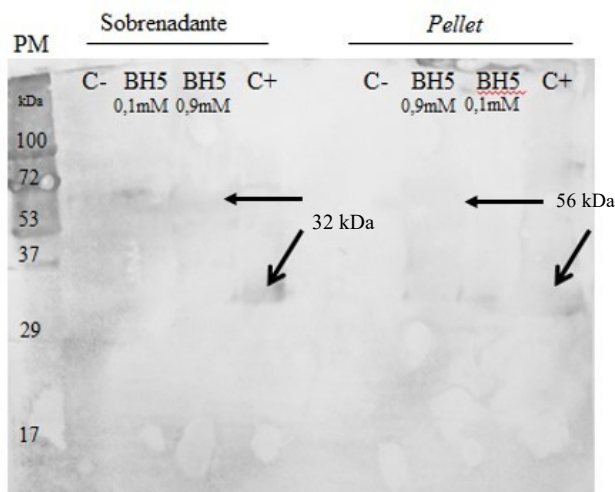
O clone 5 (BLCBH5) foi selecionado para expressão em maior escala. Após a expressão, as células foram coletadas, lisadas e tanto o sobrenadante como o *pellet* foram analisados por SDS-PAGE. Foi possível observar uma banda proteica com massa molecular próxima à esperada para GST-Balternina principalmente no *pellet* (resultado não mostrado). Segundo Jiang *et al.* (2009), o uso de concentração menor de IPTG, temperatura mais baixa (26 °C) e adição de MgCl<sub>2</sub> podem ser usados para evitar a formação desses corpos de inclusão. Enquanto que nas condições anteriores (0,9 mM de IPTG e 37°C) a banda proteica

não era facilmente observada no sobrenadante, nestas condições, a banda proteica foi observada em ambas as frações analisadas (Figura 7). A detecção da proteína na fração solúvel (sobrenadante) é vantajoso, uma vez que ela pode ser purificada na sua forma nativa, sem a utilização de agentes desnaturantes.



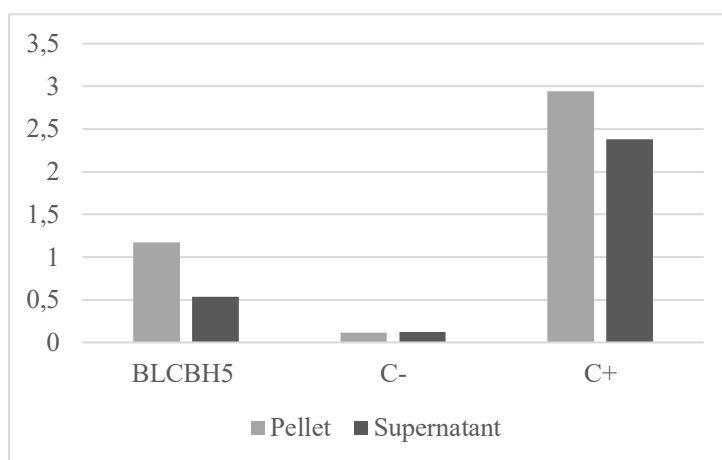
**Figura 7: SDS-PAGE da expressão bacteriana da Balternina.** Cultura de células do clone BLCBH5 (BH5) foi submetida à indução da expressão da GST-Balternina por IPTG com duas concentrações (0,1 mM e 0,9 mM), conforme indicadas na imagem, e após a lise celular as frações do sobrenadante e do *pellet* foram submetidas à SDS-PAGE. O controle negativo (C-) utilizado foi o clone da bactéria não transformada (BLC+DE3-RIPL) e o controle positivo (C+) foi o clone transformado apenas com o vetor que expressa a proteína GST (BL21DE3A). As setas horizontais referem-se a banda proteica da Balternina + GST que corresponde a 56 kDa, enquanto que as setas inclinadas indicam a banda proteica referente apenas a proteína GST que corresponde a 32 kDa.

Após avaliar a expressão bacteriana por SDS-PAGE, também foi realizado o *Western blotting* das amostras dos clones bacterianos, utilizando anticorpo monoclonal contra 6xHis (anti-6xHis). Como resultado, foi possível observar apenas bandas proteicas no controle positivo, que corresponde ao clone transformado com o vetor (BL21DE3A), e que expressa a proteína GST (Figura 8).



**Figura 8: Western blotting da expressão bacteriana da Balternina.** Análise da expressão da GST-Balternina pelo clone BLCBH5 (BH5), utilizando duas concentrações de IPTG (0,1 e 0,9 mM, conforme indicado nas raías) nas frações do sobrenadante e do *pellet*. O controle negativo (C-) utilizado foi o clone sem transformação com plasmídeo (BLC+DE3-RIPL) e o controle positivo (C+) foi o clone transformado apenas com o vetor que expressa a proteína GST (BL21DE3A). As setas inclinadas indicam a banda proteica referente apenas a proteína GST (32 kDa) e as horizontais possivelmente a GST-Balternina (56 kDa). O marcador de massa molecular utilizado foi PM pré-corado (Ludwig).

Além da análise do *Western blotting*, foi realizado também o ELISA para avaliação da expressão. No ELISA, foi possível observar que houve a expressão da Bhalternina e ambas as frações analisadas (*pellet* e sobrenadante), porém, no *pellet* a expressão parece ter se apresentado um pouco maior (Gráfico 3).



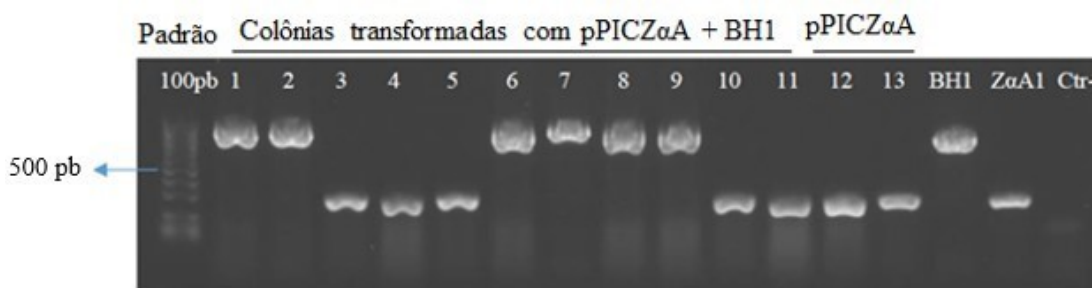
**Gráfico 3: Análise da expressão bacteriana da Balternina por ELISA.** Análise da expressão GST-Balternina pelo clone BLCBH5, na concentração de IPTG 0,9 mM, nas frações do sobrenadante e do *pellet*. O controle negativo (C-) utilizado foi o clone não transformado (BLC+DE3-RIPL) e o controle positivo (C+) foi o clone transformado com o vetor que expressa somente a proteína GST (BL21DE3A). As colunas cinzas claras referem-se as frações do *pellet*, enquanto que as colunas cinzas escuras as frações do sobrenadante.

## 5.2 Clonagem e expressão da Balternina em levedura

Para realização da expressão da Bhalternina em sistema de levedura, a *Pichia pastoris* foi a levedura de escolha, por ser de fácil manipulação, baixo custo e ciclo celular rápido quando comparado com outros sistemas eucarióticos. Além disso, possui vantagens no processamento proteico, consegue realizar modificações pós-traducionais, além de favorecer a produção em larga escala (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005).

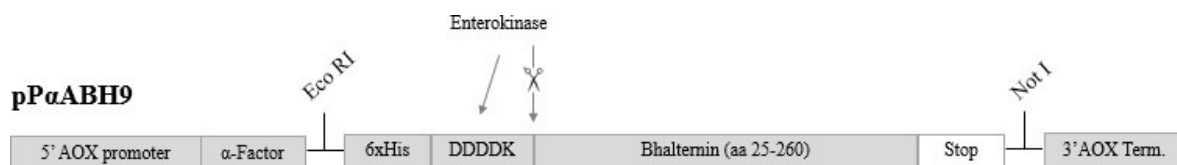
Após a realização da reação de ligação do DNA contendo a sequência codificante da Bhalternina com o vetor pPICZα A, bactérias *E. coli* cepa TOP10 foram transformadas por eletroporação e cultivadas em placas de meio LB contendo zeocina. Onze colônias isoladas foram selecionadas e submetidas a análise da presença do DNA plasmidial por PCR. As

colônias 1, 2, 6, 7, 8 e 9 apresentaram amplificação, indicando que houve a transformação das células (Figura 9).



**Figura 9: 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 massa molecular utilizado foi de 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas). Os números 1 a 11 presentes nas raias são referentes as colônias selecionadas transformadas com pPICZ $\alpha$  A + BH1, enquanto que os números 12 e 13 apenas as colônias transformadas com pPICZ $\alpha$  A (vetor de expressão). O controle negativo (C-) usado foi a mix da PCR. Como controles positivos, DNA de pPICZ $\alpha$  A (Z $\alpha$ A1) e de pPICBH1 (BH1) foram utilizados.

A colônia 9, que foi denominada de clone P $\alpha$ ABH9 (Figura 10), foi selecionada para o sequenciamento nucleotídico de seu plasmídeo e, além da sequência da Balthernina estar correta, foram também confirmadas as presenças da cauda de polihistidina (6xHis) e também do sítio de reconhecimento de clivagem DDDDK para enteroquinase suína.



**Figura 10: Estrutura parcial do pP $\alpha$ ABH9 construído.** Segmento correspondente a Balthernina madura (aa 25 a 260) foi otimizado e clonado para sistema de expressão em levedura. O esquema exhibe a sequência sinal  $\alpha$ -Factor, marcação 6xHis, e sítio DDDDK de reconhecimento e clivagem por enteroquinase.

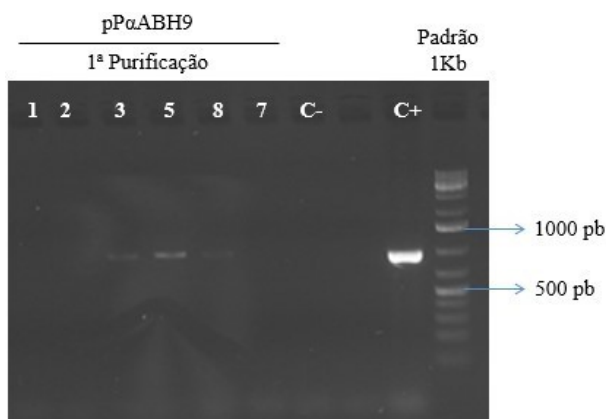
Tendo a confirmação por sequenciamento, os DNAs de pPICZ $\alpha$  A (vetor) e pP $\alpha$ ABH9 foram utilizados na transformação de *P. pastoris* cepa X-33 por eletroporação. A cepa utilizada foi a X-33, que de acordo com o manual do *kit EasySelect™ Pichia Expression*, é uma cepa *wild-type Mut<sup>+</sup>*, ou seja, metaboliza o metanol como única fonte de carbono. O promotor (AOX1) que regula a expressão da enzima é o mesmo presente no vetor pPICZ $\alpha$  A e que direciona a expressão da proteína na levedura.

Vinte colônias transformadas com pP $\alpha$ ABH9 foram selecionadas para confirmação da inserção do DNA plasmidial por PCR. Apenas as colônias 1, 2, 3, 5, e 8 apresentaram amplificação (Figura 11). Com relação ao vetor, duas colônias foram selecionadas para a PCR e ambas apresentaram amplificação. As colônias que se mostraram positivas na transformação foram submetidas a dois processos de purificação.

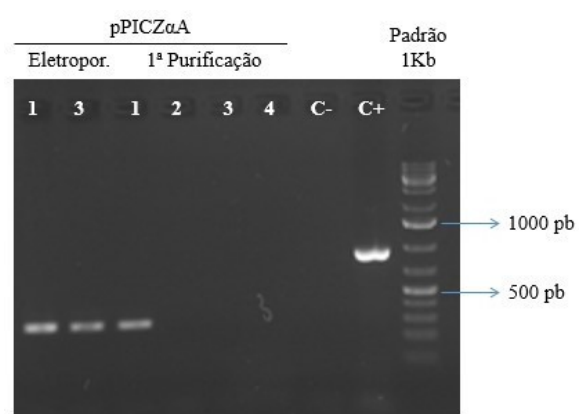
A



B



C



D

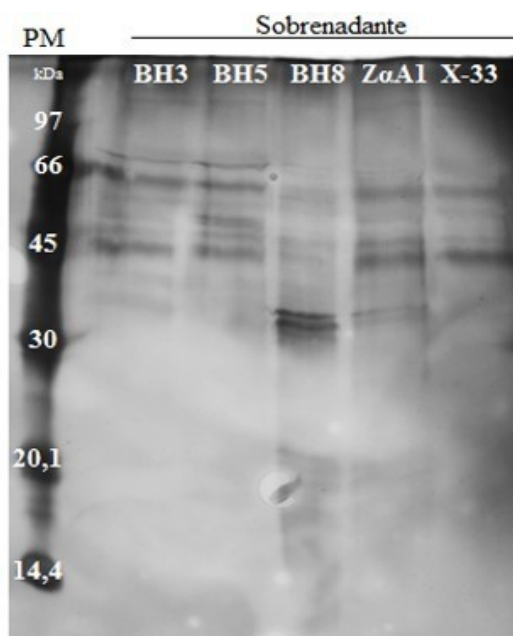


**Figura 11: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com amostras das colônias de *P. pastoris*. Com colônias obtidas após a eletroporação com pPaABH9 (A), após a primeira purificação (B) e após a segunda purificação (D); com colônias obtidas após eletroporação com pPICZα A (C), após primeira e segunda etapas de purificação (D). PM: 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas). O controle positivo usado foi o DNA pPaABH9 e o controle negativo usado foi água.**

Os clones que se mostraram positivos por PCR após as duas etapas de purificação foram os clones 3, 5 e 8 para a transformação com a pPαABH9 e apenas o clone 1 para a transformação com o vetor (pPICZα A). Portanto, estes foram denominados de PpαABH3, PpαABH5, PpαABH8 e PICZα A, e foram utilizados no processo de expressão da Bhalternina em *P. pastoris*.

Para realizar a expressão, o cultivo foi realizado por 144h, com adição de metanol para 1% a cada 24 h. Após isso, o meio foi coletado, centrifugado à 3800 xg por 3 minutos à temperatura ambiente, e as frações do sobrenadante foram analisadas por SDS-PAGE, *Western blotting* e ELISA.

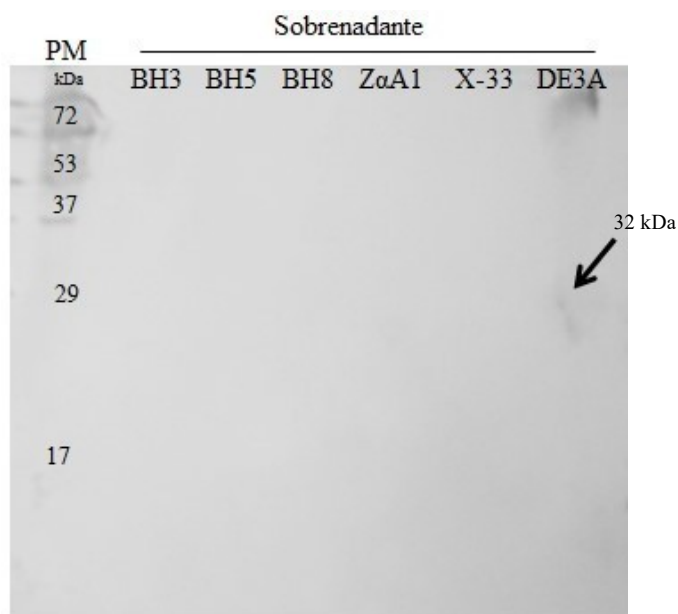
Ao avaliar a expressão por SDS-PAGE, na coloração realizada com *Coomassie Blue* não foram possíveis identificar bandas proteicas referentes à Bhalternina (dados não mostrados). Por isso, realizamos também a coloração com nitrato de prata. Apesar disso, não foi possível identificar bandas proteicas que estivessem presentes nos clones transformados com pPαABH9 e não estivessem presentes no clone transformado com o vetor ou o no clone não transformado (Figura 12). Esses resultados parecem indicar baixa expressão da Bhalternina.



**Figura 12: SDS-PAGE da expressão da Bhalternina em levedura corado com nitrato de prata.** Análise da expressão da Bhalternina com os clones PpαABH3 (BH3), PpαABH5 (BH5) e PpαABH8 (BH8) na fração do sobrenadante. Os controles negativos utilizados foram o clone sem transformação com plasmídeo (X-33) e o clone transformado apenas com o vetor (ZαA1).

Após análise por SDS-PAGE, também foi realizado o *Western blotting*, como uma segunda forma de avaliar a expressão da Bhalternina. Da mesma forma, não foram possíveis identificar bandas

proteicas formadas pela ligação do anticorpo com a cauda 6xHis (Figura 13). Indicando possivelmente baixa expressão. Isso não é compatível ao que vemos na literatura, visto que um estudo realizado por Isabel *et al.* (2016), que também clonou e expressou uma serinoprotease em *Pichia pastoris*, conseguiu obter níveis de expressão satisfatórios da sua proteína recombinante de interesse.



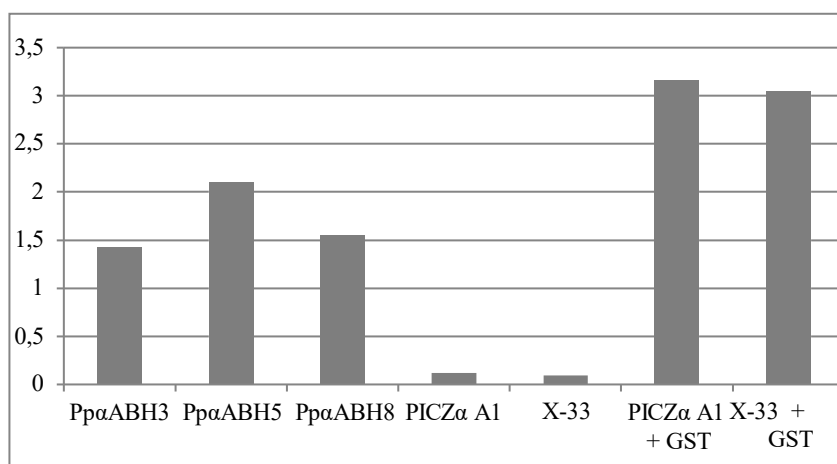
**Figura 13: Western blotting da expressão da Balternina em levedura.** Análise da expressão da Bhalternina pelos clones PpαABH3 (BH3), PpαABH5 (BH5) e PpαABH8 (BH8) na fração do sobrenadante. Os controles negativos utilizados foram o clone transformado com o vetor (*ZαA1*) e o clone não transformado (X-33). Como controle positivo (DE3), foi utilizado (sobrenadante do lisado do clone BL21DE3 A). A seta inclinada indica banda proteica referente à proteína GST (32 kDa). PM: marcador pré-corado (Ludwig).

Além disso, de acordo com o manual do *kit EasySelect™ Pichia Expression* (Invitrogen), a *Pichia* secreta baixos níveis de proteínas próprias, por isso a maior parte do que é secretado tende a corresponder à proteína de interesse. Outra questão é o fato de ter sido realizada a otimização dos códons da proteína de interesse para melhor expressão em levedura (Genscript), o que também deveria proporcionar altos índices de expressão.

A expressão em levedura também foi avaliada por ELISA, por ser um teste mais sensível que os realizados anteriormente. Os resultados indicaram que houve a expressão da Balternina com os clones PpαABH3, PpαABH5, e PpαABH8, sendo que com o clone PpαABH5 a reatividade foi um pouco maior que com os demais. Além disso, os controles negativos utilizados (PICZα A1 e X-33) se mostraram com baixa expressão, enquanto que os controles positivos (PICZα A1 + GST e X-33 + GST) apresentaram expressão (Gráfico 4).

O clone Pp $\alpha$ ABH3 apresentou reatividade 13 vezes maior que os controles negativos, o clone Pp $\alpha$ ABH5 19 vezes maior, e o clone Pp $\alpha$ ABH8 14 vezes maior. Sugerindo assim, que possivelmente ocorreu expressão da Balternina.

Ainda de acordo com o Gráfico 4, foi possível observar que os níveis de expressão obtidos em células de levedura foram próximos aos níveis de expressão obtidos em células de bactérias, o que sugere que a *Pichia pastoris* também é um bom sistema de expressão. Além disso, o fato de ter obtido bons níveis de expressão em levedura, proporciona o seu uso para a produção da Balternina recombinante, já que este sistema é mais vantajoso que o bacteriano, por conseguir realizar modificações pós-traducionais, como glicosilações, que a Balternina requer, e com isso, preservar as atividades enzimáticas e biológicas desta.



**Gráfico 4: Análise da expressão da Balternina em levedura por ELISA.** Os sobrenadantes das culturas dos clones Pp $\alpha$ ABH3, Pp $\alpha$ ABH5 e Pp $\alpha$ ABH8 foram utilizados para sensibilizar os poços das placas de ELISA e o anticorpo monoclonal anti-6xHis foi utilizado para detecção da Balternina. Os controles negativos utilizados foram o clone PICZ $\alpha$  A1 (clone transformado apenas com o vetor), e o clone X-33 (clone sem transformação com plasmídeo). Os controles positivos utilizados foram as amostras dos controles negativos com adição do sobrenadante do lisado do clone bacteriano BL21DE3 A, contendo a proteína GST.

### 5.3 Testes enzimáticos

Para estes testes, foram utilizadas as seguintes amostras: *pellet* do clone bacteriano BLCBH5 ressuspensão com tampão TN, ureia 3 M ou ureia 8 M; sobrenadantes das culturas com clones Pp $\alpha$ ABH3, Pp $\alpha$ ABH5 e Pp $\alpha$ ABH8. Com o teste de coagulação, foi possível observar que apesar do clone BLCBH5 tratado com ureia 3 M ter apresentado atividade, o clone controle (BL21DE3 A) tratado com ureia 8 M também apresentou atividade, inviabilizando os resultados (Tabela 1). O fato de a amostra do vetor ter mostrado atividade no teste da coagulação pode ser devido a algum interferente do meio de cultura (Jiang *et al.*, 2009) ou mesmo aos tampões utilizados. Além disso, Costa *et al.* (2010) também demonstrou



que concentrações de ureia que excedem 1 M já são prejudiciais para a estrutura da proteína. Já com os clones da expressão em levedura da fração do sobrenadante, todos se apresentaram negativos.

**Tabela 1.** Atividade de Coagulação

Expressão em Bactéria		Expressão em Levedura	
Amostras	Atividade	Amostras	Atividade
BLCBH5 PTN <sup>a</sup>	-	PpαABH3 Sobrenadante	-
BLCBH5 PU3 <sup>b</sup>	+	PpαABH5 Sobrenadante	-
BLCBH5 PU8 <sup>c</sup>	-	PpαABH8 Sobrenadante	-
BL21DE3 A PTN	-	PICZα A Sobrenadante	-
BL21DE3 A PU3	-	C- (PBS)	-
BL21DE3 A PU8	+	C+ (Peçonha bruta)	+

<sup>a</sup> *pellet* tratado com tampão TN; <sup>b</sup> *pellet* tratado com uréia 3 M; <sup>c</sup> *pellet* tratado com uréia 8 M

No teste de degradação da azocaseína, amostras dos clones vetores (tanto da expressão bacteriana como a de levedura) apresentaram atividade, o que não nos permitiu afirmar que foi a Balternina que exerceu a atividade proteolítica.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o nosso trabalho foi possível concluir que a expressão da Balternina em sistema bacteriano foi satisfatória, visto que a Balternina parece ter sido expressa tanto na fração do sobrenadante quanto do *pellet*. O fato de a expressão ter ocorrido no sobrenadante é vantajoso para um futuro processo de purificação da proteína em condições nativas. Com a purificação será possível realizar uma melhor avaliação das atividades enzimáticas da Balternina.

A expressão da Balternina em sistema de levedura também parece ter ocorrido, em quantidades próximas a obtida pela expressão bacteriana, como foi observado pelo teste de ELISA. Porém, não conseguimos identificar esses níveis de expressão por meio de SDS-PAGE e *Western blotting*. Uma solução seria realizar modificações nos protocolos desses testes, bem como adquirir reagentes novos, para que seja possível repeti-los. Nos testes enzimáticos também não conseguimos obter os resultados esperados, portanto, eles devem ser repetidos utilizando plasma humano ou fibrinogênio novo.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, M. *et al.* Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>.
- AMORIM, F. G. *et al.* New insights on moojase, a thrombin-like serine protease from *bothrops moojeni* snake venom. **Toxins**, v. 10, n. 12, p. 1–19, 2018. BHAT, S. K. *et al.* Serine proteinases from *Bothrops* snake venom activates PI3K/Akt mediated angiogenesis. **Toxicon**, v. 124, p. 63–72, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.11.001>.
- BUSTILLO, S. *et al.* Antimicrobial activity of *Bothrops alternatus* venom from the northeast of Argentina. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 50, n. 3: p. 79-82, 2008. Disponível em: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=24270&id2=>.
- CANHAS, I. N. *et al.* Antibacterial activity of different types of snake venom from the *Viperidae* family against *Staphylococcus aureus*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 39, n. 3, p. 309-319, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v39i3.33826>.
- CARDOSO, K. C. *et al.* A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics**, v. 11, n. 605, p. 1-22, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-605>.
- CARMO, E. J. **Clonagem e expressão regulada do cDNA da glicoamilase de *Aspergillus awamori* em *Pichia pastoris***. 115p. 2010. Dissertação de Mestrado – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, 2010. Disponível em: <https://bdtd.inpa.gov.br/handle/tede/686>.
- CHOI, S.I. *et al.* Recombinant enterokinase light chain with affinity tag: expression from *Saccharomyces cerevisiae* and its utilities in fusion protein technology. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 75, p. 718-724, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.10082>.
- COSTA, C. R. C. *et al.* Edema induced by a *crotalus durissus terrificus* venom serine protease (Cdtp 2) involves the PAR pathway and PKC and PLC activation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 1–17, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19082405>.
- COSTA, J. DE 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.02.014>.
- CROW, J. M. Venomous drugs: Captopril. **New Scientist**, v. 214, n. 2863, p. 35, 2012. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0262-4079\(12\)61171-3](https://doi.org/10.1016/S0262-4079(12)61171-3).
- DA MATA, É. C. G. *et al.* Antiviral activity of animal venom peptides and related compounds. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 1–12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0089-0>.

DA SILVA SOUZA, A. *et al.* Snakebites as cause of deaths in the Western Brazilian Amazon: Why and who dies? Deaths from snakebites in the Amazon. **Toxicon**, v. 145, p. 15–24, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.02.041>.

DE OLIVEIRA, F. *et al.* Biochemical and functional characterization of BmooSP, a new serine protease from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 111, p. 130–138, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.01.055>.

DIAS, E. H. V. *et al.* Balt/PLA<sub>2</sub>: a new Phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops alternatus* snake venom with antiplatelet aggregation activity. **Protein & Peptides Letters**, v. 25, n. 10, p. 943-952, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0929866525666181004101622>.

FERNANDES DE OLIVEIRA, L. M. *et al.* Rapid purification of serine proteinases from *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* venoms. **Toxicon**, v. 76, p. 282–290, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.10.016>.

GOMES, M. S. R. **Caracterização estrutural e funcional de metaloproteases isoladas de peçonhas botrópicas**. 127p. 2013. Tese Doutorado – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/15738>.

ISABEL, T. F. *et al.* Expression and partial biochemical characterization of a recombinant serine protease from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 115, p. 49–54, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.03.002>.

JIANG, X.; XU, J.; YANG, Q. Soluble expression, purification, and characterization of Gloydus shedaoensis venom glosedobin in *Escherichia coli* by using fusion partners. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 3, p. 635–642, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2141-2>.

KEEN, H. *et al.* Human insulin produced by recombinant DNA technology: safety and hypoglycaemic potency in healthy men. **The Lancet**, v. 316, n. 8191, p. 398-401, 1980. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(80\)90443-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)90443-2).

KIM, H.; YOO, S. J.; KANG, H. A. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v. 15, n. 1, p 1-16, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12195>.

LIN-CEREGHINO, G. P. *et al.* The effect of  $\alpha$ -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 519, n. 2, p. 311–317, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.01.062>.

MACEDO, J. K. A. **Análise da Peçonha de *Bothropoides marmoratus*, com ênfase na caracterização de proteínas com atividade antimicrobiana e/ou antitumoral**. 104p. 2011. Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biológicas, Fundação Universidade de Brasília, 2011. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/handle/10482/8774>.

MAMEDE, C. C. N. **Estudo comparativo de efeitos inflamatórios locais induzidos por peçonhas botrópicas**. 130 p. 2015. Tese de Doutorado – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/12418>.

MATIAS, M. S. *et al.* BaltDC: Purification, characterization and infrared spectroscopy of an antiplatelet DC protein isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 1–8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0126-7>.

MULLER, V. D. M. **Avaliação da atividade antiviral de peçonhas de serpentes e escorpião contra os vírus da dengue e da febre amarela**. 102p. 2011. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.60.2011.tde-12072011-143446>.

MULLER, V. D. *et al.* Phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* inactivates dengue virus and other enveloped viruses by disrupting the viral envelope. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112351>.

PASCHOAL, T. S. **Caracterização bioquímica e funcional de uma fosfolipase A2 isolada da peçonha de *Bothrops alternatus***. 75p. 2015. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Uberlândia, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/12418>.

POROWINSKA, D. *et al.* Prokaryotic expression system. **Postepy Hig Med Dosw (online)** v. 67, p. 119-129, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5604/17322693.1038351>.

QUEIROZ, S. J. **Identificação da atividade antimicrobiana no veneno da serpente *Bothrops moojeni* em bactérias gram-negativas**. 93p. 2010. Dissertação de Mestrado – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2010. Disponível em: <http://localhost:8080/tede/handle/tede/3410>.

RODRIGUES, J. P. **Avaliação *in vitro* da atividade antihelmíntica da toxina BnSP-6 Contra *Strongyloides venezuelensis* e seu Rastreamento Utilizando CdSE/CdS Magic Sized Quantum Dots**. 53p. 2017. Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/19768>

ROSAS, N. S. C.; **Efeitos de venenos totais de serpentes brasileiras sobre *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi***. 81 p. 2013. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, 2013. Disponível em: <https://siduece.uece.br/siduece/trabalhoAcademicoPublico.jsf?id=83578>.

RUBINI, M. R. **Clonagem, expressão heteróloga e caracterização funcional de uma endoglicanase de *Penicillium echinulatum***. 155p. 2009. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2009. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/handle/10482/4419>.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**. A laboratory manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SILVEIRA, J. L.; MACHADO, C. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos nos municípios do sul de Minas Gerais. **Journal Health NPEPS**, v. 2, n. 1, p. 88–101, 2017. Disponível em: <https://periodicos.unemat.br/index.php/jhnpeps/article/view/1774>.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A review and database of snake venom proteomes. **Toxins**, v. 9, n. 9, p. 1-23, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>.

UTKIN, Y. N. Animal venom studies: current benefits and future developments. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 28-33, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i2.28>.

VU, T. T. *et al.* Batroxobin binds fibrin with higher affinity and promotes clot expansion to a greater extent than thrombin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 23, p. 16852-16871, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.464750>.

ZANPHORLIN, L. M. **Caracterização bioquímica de uma serinoprotease produzida pelo fungo termofílico *Myceliophthora* sp.** 82p. 2010. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, campus São José do Rio Preto, 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/87517>.

ZHU, T. *et al.* *Pichia pastoris* as a versatile cell factory for the production of industrial enzymes and chemicals: current status and future perspectives. **Biotechnology Journal**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/biot.201800694>.