

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Expressão e caracterização citotóxica de uma protease clonada da glândula de *Bothrops pauloensis*

Marília de Freitas Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso II
apresentado à Coordenação do Curso de
Biotecnologia, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de
Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Agosto – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Expressão e caracterização citotóxica de uma protease clonada da glândula de *Bothrops pauloensis*

Marília de Freitas Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues

Co-orientadora: Dra. Daiana Silva Lopes

Trabalho de Conclusão de Curso II
apresentado à Coordenação do Curso de
Biotecnologia, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de
Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Agosto – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Expressão e caracterização citotóxica de uma protease clonada da glândula de *Bothrops pauloensis*

Marília de Freitas Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues
Instituto de Genética e Bioquímica

Co-orientadora: Dra. Daiana Silva Lopes
Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em __/__/____

Coordenador do Curso: Prof. Dr Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG
Agosto – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Expressão e caracterização citotóxica de uma protease clonada da glândula de *Bothrops pauloensis*

Marília de Freitas Oliveira

Aprovado pela Banca Examinadora em: 14/08/2017

Nota: _____

Presidente da Banca Examinadora: Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues

Ass: _____

Uberlândia, 14 de agosto de 2017

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Dra. Renata Rodrigues Santos, pela oportunidade de fazer parte do LaBiTox, pela orientação durante a realização do trabalho e apoio em todos os momentos.

À Dra. Daiana Silva Lopes, pela confiança desde o início, co-orientação e conselhos dados durante todo esse ano.

À Dra. Tássia Rafaella Costa, pela recepção e pela possibilidade de estagiar no Laboratório de Toxinologia em Ribeirão Preto.

À professora Dra. Veridiana Melo Rodrigues, pela disponibilidade de estrutura para a realização deste trabalho.

Às técnicas Marina e Tianinha, por toda ajuda durante os experimentos e excelente convivência diária.

Aos colegas de laboratório, em especial Anna Cecília, Paulo Cuevas, Vitor, Sarah e Isabela, por compartilharem as experiências científicas (e não científicas), colaborando sempre na realização dos experimentos e por deixar o dia mais alegre.

Aos meus pais, por terem me apoiado em todas as decisões e consequentes mudanças profissionais. Sem eles eu não teria chegado até aqui.

Aos queridos B8, por terem me recebido como se fosse uma deles, e por todos os momentos vividos durante esses anos. Em especial ao Daniel e a Mônica, pela amizade e ajuda em todas as circunstâncias, mesmo à distância durante meu intercâmbio!

À minha avó Vanda, que me apoiou muito durante o cursinho na transição engenharia-biotecnologia.

À todos os professores do curso de Biotecnologia, pelo enorme conhecimento passado que fez com que eu me apaixonasse pela profissão.

À Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, FAPEMIG e CAPES, por propiciar a minha formação.

Agradeço a todos que tenham colaborado de alguma forma na realização deste trabalho e durante a minha graduação.

RESUMO

Existem no Brasil duas famílias de serpentes peçonhentas: Elapidae e Viperidae. Dentre as serpentes peçonhentas encontradas no território brasileiro, a espécie *Bothrops pauloensis* se destaca na região do Triângulo Mineiro. Essa serpente é caracterizada por apresentar aparelho inoculador de peçonha, que quando inoculada na presa leva a diversas alterações no organismo, principalmente no sistema hemostático. Os estudos relacionados ao mecanismo de ação de toxinas da peçonha de serpentes contribuiu para a elaboração de novos fármacos. Diversas toxinas de serpentes foram caracterizadas com a capacidade de inibir a proliferação celular e promover a morte de células tumorais. Entretanto, pouco se sabe sobre o modo de ação de serinoproteases em células tumorais. As serinoproteases de peçonha de serpentes (SVSPs) são glicoproteínas com estrutura semelhante à tripsina e são pouco expressas em peçonhas da espécie *B. pauloensis*. Dessa forma, o uso de tecnologias como a expressão heteróloga de proteínas possibilita a obtenção de proteína com modificações pós-traducionais e em escala industrial. O objetivo deste trabalho foi realizar a expressão da proteína recombinante (rBpSP-I) de *B. pauloensis* em *Pichia pastoris*, a purificação em cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA Superflow e, posteriormente, a caracterização bioquímica e funcional, pelas atividades coagulante, fibrinogenolítica e citotóxica sobre células tumorais (HL-60, HepG2, MCF7) e não tumorais (PBMC). A serinoprotease apresenta enorme potencial biotecnológico, pois apresentou citotoxicidade significativa frente às células tumorais, o que nunca foi descrito na literatura. Além disso, a proteína recombinante não apresentou citotoxicidade significativa às células do PBMC, o que pode sugerir que sua ação seja direcionada a células cancerígenas.

Palavras-chave: Serinoproteases, *Pichia pastoris*, proteína recombinante, antitumoral.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Potencial antitumoral de toxinas isoladas de serpentes	1
1.2. Diversidade das Serpentes Peçonhentas	2
1.3. Serinoproteases	5
1.4. Expressão heteróloga	8
1.5. Justificativa	9
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. Objetivo geral	10
2.2. Objetivos específicos	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Meios de cultura	10
3.1.1. Meio BMGY pré-inóculo	10
3.1.2. Meio BMGY geração de biomassa	10
3.1.3. Meio BMMY de indução	11
3.2. Expressão da serinoprotease recombinante da glândula de <i>B. pauloensis</i>	11
3.3. Purificação da serinoprotease recombinante de <i>B. pauloensis</i> em resina de níquel Ni-NTA Superflow	11
3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)....	12
3.5. Caracterização bioquímica	13
3.5.1. Dosagem e recuperação proteica	13
3.5.2. Dot blotting	13
3.6. Caracterização funcional	13
3.6.1. Atividade coagulante sobre o plasma bovino	13
3.6.2. Atividade fibrinogenolítica	13
3.7. Linhagens celulares	14
3.7.1. Manutenção da linhagem celular em suspensão (HL-60)	14

3.7.2.	Subcultivo da HL-60	14
3.7.3.	Manutenção da linhagem celular aderente (HepG2, MCF-7 e Hek239).....	15
3.7.4.	Subcultivo da HepG2, MCF-7 e Hek239	15
3.7.5.	Extração de células mononucleares de sangue total (PBMC).....	15
3.8.	Teste de citotoxicidade	16
4.	RESULTADOS	17
4.1.	Expressão da serinoprotease recombinante da glândula de <i>B. pauloensis</i>	17
4.2.	Purificação da serinoprotease recombinante de <i>B. pauloensis</i> em resina de níquel Ni-NTA Superflow	17
4.3.	Caracterização bioquímica	18
4.3.1.	Dosagem proteica	18
4.3.2.	Dot blotting	18
4.4.	Caracterização funcional	19
4.4.1.	Atividade coagulante sobre o plasma bovino	19
4.4.2.	Atividade fibrinogenolítica	19
4.5.	Teste de citotoxicidade	21
5.	DISCUSSÃO	22
6.	CONCLUSÃO	25
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Acidentes por serpentes registrados por região de notificação de 2010 a 2015. Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS). 4
- Figura 2.** Serpente da espécie *Bothrops pauloensis*. Fonte: The Reptile Database. 4
- Figura 3.** Modelo tridimensional de AhV_TL-I (arquivo PDB 4E7N), uma *thrombin-like* isolada da peçonha de *Agkistrodon halys pallas* (ZENG et al., 2013), evidenciando a tríade catalítica em magenta (His57, Asp102 e Ser 195), em verde são representadas as regiões de extensão, em vermelho e amarelo respectivamente as estruturas em α -hélice e em a β -folha pregueada. 6
- Figura 4.** Padrão catalítico da trombina e SVTLEs sobre o fibrinogênio. α , β e γ simbolizam as cadeias do fibrinogênio e A e B os fibrinopeptídeos resultantes da ação hidrolítica das proteínas (CASTRO et al., 2004). 7
- Figura 5.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 4-20%. Expressão da rBpSP-I recombinante em levedura *P. pastoris* em meio BMMY pH 7. MM: padrão de massa molecular, 1: 0h, 2: 24h, 3: 48h, 4: 72h, 5: 96h. Foram aplicados 5 μ L do padrão de massa molecular e 20 μ L do sobrenadante de todos os tempos de indução. A seta em vermelho indica a proteína recombinante. 17
- Figura 6.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 4-20%. Perfil de purificação da rBpSP-I em resina de níquel Ni-NTA Superflow. MM: marcador molecular; eluição da proteína nos gradientes 25 (1), 50 (2) e 75 mM (3) de imizadol da cromatografia por afinidade. 18
- Figura 7.** Detecção da rBpSP-I recombinante produzida em *P. pastoris*. Membrana de nitrocelulose contendo as amostras 1: controle negativo (BSA), 2 e 3: rBpSP-I purificada. Amostras incubadas com o anticorpo primário anti-His tag (1:1000) e anticorpo secundário Anti-IgG conjugado com peroxidase (1:5000). 18
- Figura 8.** Coágulo formado em 85 segundos após incubação de 15 μ g de rBpSP-I com plasma bovino a 37°C. 19

Figura 9. Atividade fibrinogenolítica da serinoprotease recombinante em gel de poliacrilamida a 12,5%. Diferentes concentrações de rBpSP-I foram incubados com 50 µg de fibrinogênio bovino (1mg/mL) a 37°C por 1 hora. 1: Fibrinogênio bovino (50 ug); 2: peçonha bruta de *Bothrops moojeni*; 3: rBpSP-I (5 µg); 3: rBpSP-I (10 µg); 3: rBpSP-I (15 µg); 3: rBpSP-I (20 µg); 3: rBpSP-I (30 µg)..... 20

Figura 10. Atividade fibrinogenolítica da serinoprotease recombinante em gel de poliacrilamida a 12,5%. 10 µg de rBpSP-I foram incubados com 50 µg de fibrinogênio bovino (1mg/mL) a 37°C de forma tempo dependente. MM- marcador molecular; 1- Fibrinogênio bovino controle; 2- peçonha bruta de *B. moojeni*; 3- 5'; 4- 10'; 5- 30'; 6- 1h e 7- 2h..... 20

Figura 11. Análise de citotoxicidade da rBpSP-I em Hek293 (A), PBMC (B), HL-60 (C), HepG2 (D) e MCF7 (E), por teste de MTT. As culturas de células foram tratadas com diferentes concentrações da serinoprotease (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 µg/mL) por 24h. 22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNO₃ – Nitrato de Prata

AOX1 – Alcohol Oxidase

BMGY – Buffered Glycerol-Complex Medium

BMMY – Buffered Methanol-Complex Medium

BSA – Soroalbumina Bovina

Ca²⁺ – Íon Cálcio

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CO₂ – Dióxido de Carbono

CRISP – Cysteine-Rich Secretory Protein

DAB – 3,3' diaminobenzidina

DMSO – Dimetilsulfóxido

ECL – Electrochemiluminescence

EST – Expressed Sequence Tag

HCl – Ácido Clorídrico

kDa – KiloDaltons

LAO – L-aminoácido Oxidases

MTT – 3-(4,5-dimetil tiazol 2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium

NaCl – Cloreto de Sódio

NaH₂PO₄ – Fosfato de Sódio

Ni-NTA – Ácido Nitrilotriacético com Íon Níquel

PBS – Phosphate Buffered Saline

PLA_{2S} – Fosfolipases A₂

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

rBpSP-I – Recombinant *Bothrops pauloensis* Serine Protease I

rBpSP-II – Recombinant *Bothrops pauloensis* Serine Protease II

SDS-PAGE – Dodecil-sulfato de Sódio de Poliacrilamida

SVSPs – Snake Venom Serine Proteases

SVTLE – Snake Venom Thrombin-Like Enzymes

TBS – Tris-Buffered Saline

TBS-T – Tris-Buffered Saline Tween

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

YNB – Yeast Nitrogen Base

1. INTRODUÇÃO

1.1. Potencial antitumoral de toxinas isoladas de serpentes

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, cerca de 8,2 milhões de pessoas morrem por ano de câncer no mundo e, em 2016, estima-se que esse número no Brasil foi de 600 mil pessoas. Os tipos mais incidentes no mundo são o câncer de pulmão e o câncer de mama. No Brasil, o mais recorrente é o câncer de pele não melanoma (INCA, 2015).

As células tumorais tem funcionamento diferenciado de células não tumorais e as principais alterações celulares são: auto-suficiência em fatores de crescimento, insensibilidade para sinais de inibição de crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial ilimitado de replicação, angiogênese sustentada, capacidade de invadir tecidos e criar metástases (HANAHA; WEINBERG, 2000).

Para o tratamento dessa patologia, os principais alvos das pesquisas atuais são os fatores que promovem a multiplicação descontrolada e genes característicos de células tumorais que afetam a sinalização celular, a cromatina, a regulação epigenômica, *splicing* e o metabolismo de proteínas (GARRAWAY; LANDER, 2013; VITA et al., 2000). Existem três tipos de drogas utilizadas para o tratamento de câncer, as drogas que bloqueiam a síntese de DNA, drogas que causam danos ao DNA e drogas que interrompem a mitose (JIANG et al., 2006).

Na busca por moléculas que apresentam interesse biotecnológico e farmacêutico, as toxinas de animais como serpentes, formigas, sapos, aranhas, escorpiões tem sido alvo de estudo de diversos pesquisadores (FENARD et al., 1999; LEWIS; GARCIA, 2003). Recentemente, algumas toxinas foram purificadas e caracterizadas por apresentarem ações farmacológicas, como a Hc-CATH, isolada da peçonha da serpente *Hydrophis cyanocinctus*, que possui características antimicrobianas e anti-inflamatórias (WEI et al., 2015); A-Myrtoxin-Mp1a, um peptídeo isolado da formiga *Myrmecia pilosula* conhecida como “*Jack Jumper*” com atividade antimicrobiana, nociceptiva e no rompimento de membrana (DEKAN et al., 2017), brevinin-1, um peptídeo com ação antioxidante purificado da secreção da rã *Rana italica* (CONLON et al., 2017), e a Ts1, uma neurotoxina presente na peçonha do escorpião amarelo *Tityus serrulatus* caracterizado como antifúngico (SANTUSSI et al., 2017)

A citotoxicidade de certas peçonhas de serpentes ocorre devido a forte afinidade da peçonha por células e tecidos. Apesar desse efeito toxicológico da peçonha, diferentes proteínas foram caracterizadas com atividade de interesse ao ser humano e são utilizados para

fins farmacêuticos (CALDERON et al., 2014). Estudos com toxinas isoladas da peçonha de serpentes descreveram moléculas com efeitos antimicrobiano, antiviral, antiparasitário, antifúngico e interferência em patologias vasculares (CASTILLO et al., 2012; HUBBARD et al., 2012; KOH; KINI, 2012; MULLER et al., 2012; PASSERO et al., 2007; SAMY et al., 2012; WEN et al., 2013; YAMANE et al., 2013).

Moléculas derivadas de peçonha de serpentes tem, ainda, ação sobre células tumorais, podendo inibir a proliferação e adesão celular, induzir a apoptose, diminuir o volume tumoral e afetar a viabilidade de células tumorais (CHIANG; YANG; HUANG, 1996; DEBNATH et al., 2010). Foi descrito na literatura que a peçonha de *Bitis arietans*, *Cerastes gasperettii*, *Echis coloratus* e *Echis pyramidum* é capaz de reduzir a motilidade de células de câncer de mama e colorretal, formação de colônias e invasão celular (AL-ASMARI et al., 2016). Algumas toxinas isoladas de peçonha de serpentes com ação antitumoral foram descritas na literatura. A rhodostomina é uma desintegrina que apresenta inibição da adesão, da migração e da invasão de células tumorais de câncer de mama e próstata (YANG et al., 2005). Colombistatina purificada da peçonha de *Bothrops colombiensis* e pode inibir a agregação plaquetária, adesão e migração de células tumorais de melanoma (SÁNCHEZ et al., 2009). Bothropoidina uma metaloprotease da peçonha de *B. pauloensis* com ação inibidora da adesão e migração de células tumorais de câncer de mama (GUIMARÃES et al., 2017). Assim como a Bothropoidina, a fosfolipase A₂ BnSP-6 apresentou atividade frente a adesão e migração de células de tumor de mama (AZEVEDO et al., 2016).

Atualmente, o tratamento de câncer é um grande desafio para a comunidade médica. As terapias utilizadas são de alto custos e apresentam inúmeros efeitos adversos, trazendo ao paciente dor física, angústia, além de ser impactado economicamente. Os efeitos terapêuticos das toxinas isoladas das peçonhas de serpentes apresentam aplicações biomédicas promissoras em diversas doenças, incluindo o câncer (AZEVEDO et al., 2016; HANAHAN; WEINBERG, 2000; RODRIGUES et al., 2015). Dessa maneira, numerosos estudos são realizados com o intuito de identificar compostos presentes na peçonha de serpentes que possuam ação antitumoral e caracterizar o mecanismo de ação dessas toxinas.

1.2. Diversidade das Serpentes Peçonhentas

O Brasil é um país com extenso território e enorme biodiversidade. Desde o século XVII, pesquisas são feitas a fim de classificar e catalogar as espécies animais que aqui se encontram. Desde então, foram catalogadas 773 espécies de répteis, em que 36 são da ordem Testudines, 6 da Crocodylia e 731 da Squamata. Desses 731, 73 são anfisbenas, 266

“lagartos” e 392 serpentes (BÉRNILS; COSTA, 2015). No Brasil, existem duas famílias de serpentes peçonhentas, Elapidae e Viperidae, que apresentam glândulas produtoras de peçonha e aparelho inoculador (CARDOSO et al., 2003). Mais de 30 espécies e sub espécies do gênero *Bothrops* são encontradas na América Central e do Sul (CIDADE et al., 2006).

A peçonha de serpentes da família Viperidae é composta por variadas proteínas ativas como metaloproteases, fosfolipases A₂, serinoproteases, L-aminoácido oxidases, hialuronidases, fator X e ativadores e protrombina, toxinas que estimulam ou inibem a função plaquetária, peptídeos potenciadores de bradicinina, dentre outras (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006). Quando a peçonha é inoculada, essas proteínas desencadeiam reações no organismo que podem levar à morte ou a imobilização da presa (Q.; CLEMETSON; CLEMETSON, 2005). O envenenamento é caracterizado por lesão no local da picada e resposta inflamatória que pode levar a necrose tecidual severa e distúrbios sistêmicos (GUTIÉRREZ et al., 1995; MARTINES et al., 2014).

Numerosos estudos com peçonhas de serpentes foram realizados, em que toxinas foram isoladas e caracterizadas funcionalmente e estruturalmente. Desse modo, foi possível compreender os mecanismos dos envenenamentos e qualificar o tratamento de vítimas de acidentes ofídicos (CALDERON et al., 2014; SCHONI, 2005). Além disso, a elucidação do mecanismo de ação de diferentes toxinas possibilitou a aplicação destas no tratamento de doenças humanas, como hipertensão, trombose e câncer. Um exemplo é o Captopril®, um medicamento com efeito hipotensivo, desenvolvido a partir de peptídeos isolados da peçonha de *B. jararaca* (FERREIRA, 1965). Deste modo, as toxinas de peçonha de serpentes tem demonstrado aplicabilidade promissora para o desenvolvimento de novos fármacos.

Segundo o Ministério da Saúde (2014), os acidentes ofídicos de maior importância e distribuição no Brasil são causados pelo gênero *Bothrops* (Figura 1). A *Bothrops pauloensis* (Figura 2) é uma espécie encontrada na região do Triângulo Mineiro e é característica principalmente de plantações (VALLE; BRITES, 2008). Esta espécie se alimenta de pequenos vertebrados e centopéias encontrados em regiões secas, de clima semiárido ou semitropical (VALDUJO; NOGUEIRA; MARTINS, 2002).

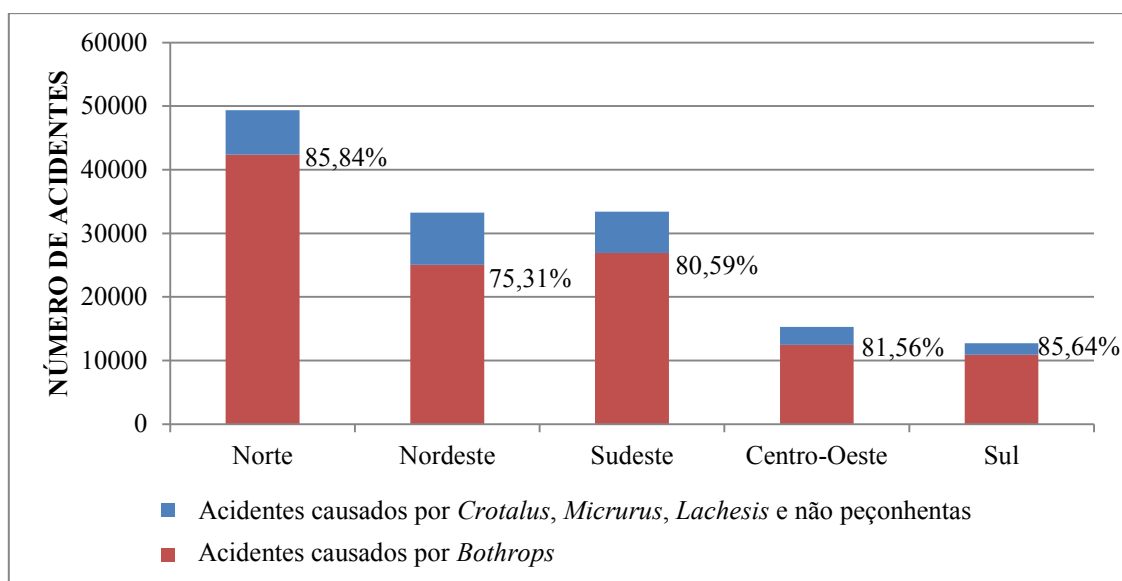


Figura 1. Acidentes por serpentes registrados por região de notificação de 2010 a 2015. Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS).



Figura 2. Serpente da espécie *Bothrops pauloensis*. Fonte: The Reptile Database.

A peçonha botrópica é caracterizada por apresentar três principais ações: proteolítica, coagulante e hemorrágica. A presença de fosfolipases na peçonha causa edema por inflamação no local da lesão e pode levar a necrose (KINI, 2003). A atividade coagulante da peçonha ocorre devido a fatores presentes na peçonha ativadores de protrombina e do fator X, alterando a hemostasia. A ação hemorrágica ocorre principalmente devido a ação de metaloproteases da peçonha no endotélio vascular na área do trauma e pode causar hipovolemia, hipotensão, hiperfusão tecidual, choque cardiovascular e acidente vascular cerebral (RIBEIRO; JORGE, 1997; SANCHEZ et al., 2015).

O estudo do transcriptoma da glândula da peçonha de *B. pauloensis* identificou que 41,9% das sequências expressas (EST) são toxinas. As classes de toxinas presentes na

peçonha foram 38% de metaloproteases, 32% de PLA₂s, 12,4% de peptídeos vasoativos e 10,5% de serinoproteases. As outras classes de proteínas como L-aminoácido oxidases (LAO), CRISP, lectina tipo C ligante de D-galactose, fator de crescimento neural e isoformas de desintegrinas apresentam entre 0,2 a 2,8% das proteínas totais da peçonha (RODRIGUES et al., 2012).

1.3. Serinoproteases

As serinoproteases de peçonhas de serpentes (SVSPs) atuam em diferentes vias da cascata de coagulação como o sistema fibrinogenolítico, fibrinolítico, calicreína-cinina e da agregação plaquetária (BRAUD; BON; WISNER, 2000; PHILLIPS; SWENSON; MARKLAND, 2009). Na literatura, existem diversas serinoproteases de peçonha de serpentes que foram isoladas e caracterizadas a fim de compreender o funcionamento da cascata de coagulação (SERRANO, 2013). Um exemplo é a RVV-V, uma serinoprotease clonada de *Daboia russelli siamensis*, de 29 kDa com cadeia única composta por 236 aminoácidos e 6% de carboidratos que ativa o fator V da cascata de coagulação (KISIEL, 1979; TOKUNAGA et al., 1988). A Jararacussin-I isolada da peçonha de *B. jararacussu*, que degrada o fibrinogênio e é N-glicosilada, características comuns de serinoproteases de peçonhas serpentes (BORTOLETO et al., 2002; ULLAH et al., 2013).

As SVSPs fazem parte da família S1 do clã SA por apresentarem estrutura similar à quimiotripsina, em que o sítio ativo é localizado na junção de dois domínios assimétricos de folhas β (PARRY et al., 1998). Elas são glicoproteínas sintetizadas em forma de zimogênios e sua estrutura é composta por uma única cadeia polipeptídica. Essas proteínas se diferem entre si pelas massas molares que variam de 23 a 67 kDa e pelo número de sítios de glicosilação N- ou O- ligados (BRAUD; BON; WISNER, 2000). Estão presentes na estrutura das SVSPs doze resíduos de cisteína, em que dez juntas formam cinco pontes dissulfeto, equivalente a estrutura da tripsina, e as duas restantes formam uma ponte dissulfeto característica das serinoproteases de peçonha de serpentes (ITOH et al., 1987; SERRANO; MAROUN, 2005).

Existe um resíduo de serina reativo na estrutura das SVSPs com papel importante no mecanismo de atividade catalítica, o que justifica a sensibilidade dessas proteínas a reagentes modificadores de serina, como o fenil-metil-sulfonilo (PMSF). Esse resíduo é responsável, também, pela formação do complexo acil-enzima transitório que é estabilizado pela presença de uma histidina e um resíduo de aspartato no sítio ativo (BARRETT; RAWLINGS, 1995), sendo que o conjunto dos resíduos de serina, de histidina e de aspartato na região C-terminal

das SVSPs formam a tríade catalítica Ser¹⁹⁵-His⁵⁷-Asp¹⁰² (Figura 3) (LESK; FORDHAM, 1996).



Figura 3. Modelo tridimensional de AhV_TL-I (arquivo PDB 4E7N), uma *thrombin-like* isolada da peçonha de *Agkistrodon halys pallas* (ZENG et al., 2013), evidenciando a tríade catalítica em magenta (His57, Asp102 e Ser 195), em verde são representadas as regiões de extensão, em vermelho e amarelo respectivamente as estruturas em α-hélice e em β-folha pregueada.

As SVSPs com ação semelhante à trombina são chamadas de *Snake Venom Thrombin Like Enzyme* (SVTLEs), ou seja, mimetizam algumas funções da trombina humana e animal, como a capacidade de converter o fibrinogênio em um coágulo de fibrina (CASTRO et al., 2004; OUYANG; TENG; HUANG, 1992; PIRKLE, 1998). Contudo, as SVTLEs ao contrário da trombina, promovem a hidrólise do fibrinogênio e, por isso, produzem coágulos mais frágeis facilmente dissolvidos pelo sistema fibrinolítico. Desta maneira, as *thrombin-like* são importantes ferramentas para estudos clínicos, uma vez que a produção de coágulos “frouxos” resulta em uma rápida diminuição do estoque de fibrinogênio *in vivo*, resultando em um efeito anticoagulante e desfibrinogenante e, conseqüentemente, promove a redução da viscosidade do sangue melhorando o fluxo sanguíneo (HENRIQUES; FONSECA; RAMOS, 2004;

MARKLAND, 1998). As SVTLEs coagulam o sangue *in vitro*, mas, *in vivo*, são anticoagulantes (ROSENFELD; KELEN, 1966).

A hemostasia é o equilíbrio estabelecido entre a formação do coágulo e sua completa degradação. Em situações de lesão, a coagulação é iniciada através da vasoconstrição no local do trauma, liberação de fatores pró coagulantes que induzem a agregação plaquetária (BRAUD; BON; WISNER, 2000).

As *thrombin-like* promovem a coagulação do fibrinogênio por clivarem e liberarem os fibrinopeptídeos das cadeias α , β e γ do fibrinogênio (Figura 4). Assim, essas proteínas podem ser classificadas em SVTLE-AB, SVTLE-A, SVTLE-B de acordo com os fibrinopeptídeos que liberam com a hidrólise do fibrinogênio (CASTRO et al., 2004). As SVTLEs geralmente estão associadas a mecanismos ligados ao fibrinogênio na cascata de coagulação. Todavia, existem enzimas descritas que atuam sobre outros fatores da coagulação ativando os fatores V (ROSING et al., 2001) e XIII (AMICONI et al., 2000).

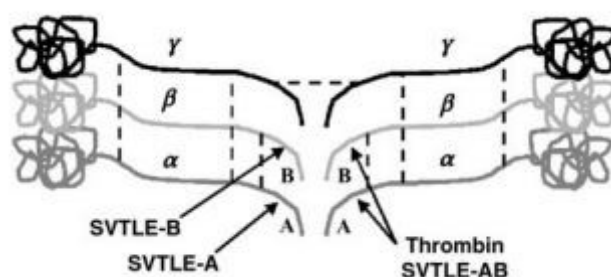


Figura 4. Padrão catalítico da trombina e SVTLEs sobre o fibrinogênio. α , β e γ simbolizam as cadeias do fibrinogênio e A e B os fibrinopeptídeos resultantes da ação hidrolítica das proteínas (CASTRO et al., 2004).

BpSP-I, proteína nativa utilizada como referência neste trabalho, é uma SVSP isolada de *Bothrops pauloensis* que representa 3% das proteínas totais da peçonha dessa serpente e possui cadeia polipeptídica única de aproximadamente 34 kDa em condições redutoras e 30 kDa em condição não redutoras. É uma *thrombin-like*, apresenta alta homologia com enzimas coagulantes, o que foi confirmado pela presença de um resíduo de valina na primeira posição N-terminal da cadeia polipeptídica, e catalisa a hidrólise de S-2238, substrato específico de enzimas *thrombin-like* (COSTA et al., 2009). Essa serinoprotease não apresenta atividade fibrinolítica, não degrada coágulo de fibrina, mas é capaz de tornar o sangue de camundongos incoagulável e apresentar atividade fibrinogenolítica (COSTA et al., 2009).

Diversos artigos demonstraram o efeito de toxinas isoladas de peçonha de serpentes em inibir a proliferação celular e promover a morte de células tumorais. Os mecanismos variam entre indução da apoptose por aumento de fluxo de Ca^{2+} , indução da liberação de

citocromo C e aumento ou diminuição da expressão de proteínas que controlam o ciclo celular, fatores que levam à degradação de membranas celulares (VYAS et al., 2013). No entanto, até o presente momento, nenhum estudo demonstrou a ação de serinoproteases nos diversos eventos celulares citados acima.

1.4. Expressão heteróloga

Nesse contexto, para o estudo detalhado de funções e da estrutura de moléculas biológicas, o uso da técnica da expressão heteróloga possibilita a obtenção de proteínas funcionais em escala industrial. A produção de proteína recombinante está presente na indústria farmacêutica e na produção de enzimas industriais (PORRO et al., 2011). Em 1980, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o uso clínico da insulina recombinante obtida de *Escherichia coli*, a primeira proteína recombinante farmacêutica do mercado. Desde então, a indústria biotecnológica cresceu bastante e, com isso, 25% dos produtos farmacêuticos são originados de fermentação microbiana (MARTÍNEZ et al., 2012).

A produção de uma proteína recombinante requer um sistema de expressão apropriado para que a produção tenha um alto rendimento, mas também proporcione a obtenção de proteínas funcionais. Desta maneira, diferentes sistemas heterólogos são utilizados para expressão de proteínas, como bactérias (FAN, 1999; JIANG; XU; YANG, 2010; LIN et al., 2009; MAEDA et al., 1991; YANG et al., 2009; ZHA et al., 2003) leveduras (MUANPASITPORN; ROJNUCKARIN, 2007; YANG et al., 2009; YOU et al., 2004) e células de mamíferos (YONAMINE et al., 2009). Entretanto, algumas proteínas apresentam estruturas complexas, com glicosilação e pontes dissulfeto, o que demanda a utilização de um sistema de expressão eucariótico (HORVAT; ZOLDOŠ; LAUC, 2011).

Pichia pastoris é uma levedura que apresenta robusto sistema de expressão, realizando modificações pós-traducionais tais como glicosilação, formação de ligações dissulfeto e processamento proteolítico (CEREHINO; CREGG, 2000; MUANPASITPORN; ROJNUCKARIN, 2007). Ademais, a utilização de *P. pastoris* como sistema de produção de proteínas apresenta diversas vantagens como o rápido crescimento da cultura, produtividade alta, eliminação de endotoxina e contaminação por bacteriófagos, fácil manipulação genética, ausência de patogenicidade e a possibilidade de purificar a proteína diretamente do meio (LI et al., 2007). Algumas proteínas recombinantes foram produzidas por este sistema como a transpeptidase Sortase A, isolada de *Staphylococcus aureus*, a protease TvLEGU-1, isolada de *Trichomonas vaginalis*, e a serinoprotease rCollineina-1, isolada de *Crotalus durissus collilineatus*, mostrando o futuro potencial desse sistema de produção microbiana

(BOLDRINI-FRANÇA et al., 2015; CEREGHINO; CREGG, 2000; RESÉNDIZ-CARDIEL; ARROYO; ORTEGA-LÓPEZ, 2017; ZHAO; HONG; WU, 2017).

Diante de tais benefícios, acredita-se que a escolha de *P. pastoris* como sistema de expressão da proteína recombinante rBpSP-I é conveniente e poderá auxiliar em um melhor entendimento quanto ao mecanismo de ação desta toxina frente às células tumorais.

1.5. Justificativa

Atualmente, a terapia contra o câncer apresenta adversidades como o alto custo do tratamento e efeitos colaterais, que podem levar a desistência do tratamento pelo paciente. Os sintomas mais recorrentes são dor, cansaço e estresse emocional. Efeitos tardios podem aparecer meses ou até anos depois que o tratamento foi feito (BATISTA; MATTOS; DA SILVA, 2015; PATRICK et al., 2004). Além disso, a maioria dos tratamentos não são específicos para os diferentes tipos de câncer e estágio de desenvolvimento da doença. Dessa forma, a busca por novos tratamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais é de fundamental importância para a sociedade.

Nesse contexto, diversas toxinas isoladas de peçonha de serpentes tem sido exploradas pelo seu potencial antitumoral e antiangiogênico (ACHÊ et al., 2015; AZEVEDO et al., 2016; GUIMARÃES et al., 2017; RODRIGUES et al., 2009). Algumas toxinas são capazes de inibir a adesão de células de câncer, a migração e a angiogênese como a fosfolipase A₂ MVL-PLA₂ e BthTX-I de *Macrovipera lebetina transmediterranea* e *Bothrops jararacussu* respectivamente (BAZAA et al., 2009; GEBRIM et al., 2009). Entretanto, existem poucos trabalhos na literatura que mostram o efeito de SVSPs em células tumorais. Essas proteínas são capazes de inibir a coagulação sanguínea e degradar o fibrinogênio (SERRANO; MAROUN, 2005). Testes com outros compostos que também apresentam ação anticoagulante e fibrinogenolítica, como suramina e heparina, mostraram importante regressão tumoral (ZACHARSKI et al., 1992).

Dessa maneira, o estudo da ação de serinoproteases em células tumorais se mostra relevante, podendo se tornar um potencial fármaco para o tratamento de neoplasias. Para tal, o uso da tecnologia da expressão heteróloga é interessante, uma vez que pode-se produzir toxinas recombinantes em larga escala para serem utilizadas nos ensaios e com as modificações pós-traducionais que garantam sua funcionalidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral é expressão e caracterização citotóxica da serinoprotease (rBpSP-I) clonada da glândula de *B. pauloensis*.

2.2. Objetivos específicos

- Expressão de uma serinoprotease clonada da glândula de *B. pauloensis*;
- Purificação da serinoprotease recombinante por cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA;
- Confirmação da expressão por *dot blot*;
- Avaliação da atividade coagulante da serinoprotease recombinante rBpSP-I;
- Avaliação da atividade fibrinogenolítica da serinoprotease recombinante rBpSP-I;
- Avaliação da citotoxicidade da serinoprotease recombinante rBpSP-I sobre células tumorais (HL-60, HepG2, MCF7) e não tumorais (Hek293 e PBMC).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Meios de cultura

3.1.1. Meio BMGY pré-inóculo

70% base (extrato de levedura 1,428%, peptona 2,856%)

20% tampão fosfato de potássio pH 7,0 (fosfato de potássio monobásico 20%; fosfato de potássio dibásico 30%)

20% YNB

20% glicerol

0,4% biotina

3.1.2. Meio BMGY geração de biomassa

70% base (extrato de levedura 1,428%; peptona 2,856%)

10% tampão fosfato de potássio pH 7,0 (fosfato de potássio monobásico 20%; fosfato de potássio dibásico 30%)

10% YNB

10% glicerol

0,2% biotina

3.1.3. Meio BMMY de indução

70% base (extrato de levedura 1,428%; peptona 2,856%)

10% tampão de potássio pH 7,0 (fosfato de potássio monobásico 20%, fosfato de potássio dibásico 30%)

10% YNB

10% metanol

0,4% biotina

3.2. Expressão da serinoprotease recombinante da glândula de *B. pauloensis*

Foi feito um pré-inóculo com uma colônia positiva contendo o inserto da serinoprotease rBpSP-I em um erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de meio BMGY e zeocina 0,05% por 17 horas a 30°C com agitação de 220 rpm. Toda a cultura foi transferida para um erlenmeyer de 2L contendo 500 mL de meio BMGY para geração de biomassa a 30°C com agitação de 190 rpm. Após 24 horas, toda a cultura foi centrifugada a 1500 xg por 5 minutos, o sobrenadante descartado, o pellet ressuscitado em 100 mL de meio BMMY de indução em um erlenmeyer de 1L a 26°C com agitação de 200 rpm. Para a indução da expressão da proteína, foi adicionado metanol 100% a cada 24 horas à cultura à concentração final de 0,75%. Antes de cada adição de metanol, 1 mL da cultura foi coletado para posterior análise em SDS-PAGE dos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

Após 96h, a cultura foi centrifugada a 10.000 xg, o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22µm e armazenado em recipiente estéril.

3.3. Purificação da serinoprotease recombinante de *B. pauloensis* em resina de níquel Ni-NTA Superflow

O sobrenadante filtrado foi submetido à cromatografia de afinidade em uma resina Ni-NTA Superflow. Para preparar a resina, o agente conservante em que a resina fica estocada, o etanol, foi retirado, a resina foi lavada com 5 volumes de água destilada e equilibrada com 5 volumes de tampão de lise (Tris 0,1M, NaH₂PO₄ 0,05M, NaCl 0,1M, pH 8,0). O sobrenadante foi, então, aplicado à resina, coletando o material eluído. Uma nova lavagem com 3 volumes

de tampão de lise foi feita, coletando o material. Para a eluição da proteína recombinante que tem afinidade pela resina, foi utilizado tampão de lise com concentrações crescentes de imidazol (10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM, pH 8,0), coletando 2 volumes da solução de 10 a 100 mM e 3 volumes da solução de 250 mM de imidazol.

Para retirar o imidazol da proteína, foi feita diálise em membrana de 7.000 MWCO, 22 mm dry diameter - *Snake Skin pleated Dialysis Tubing* (Thermo Scientific). As membranas contendo a solução de cada gradiente coletado foram colocadas em um bécker com 2L de água ultrapura refrigerada sob agitação a 4°C por 72 horas, trocando a água a cada 24 horas. Após este processo, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 4-20%) e aquelas contendo a proteína recombinante rBpSP-I foram liofilizadas para ensaios posteriores.

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

As amostras coletadas a cada 24h durante a indução e amostras dos gradientes de purificação foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 4-20% Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gel (Bio Rad). As amostras foram dissolvidas em tampão STOP [(Tris-HCl 0,06 M, pH6,8; azul de bromofenol 0,001% (m/v); glicerol 10% (v/v) e β -mercaptoetanol 10% (v/v)] na proporção 2:1 e aquecidas a 100°C por 5 minutos. A corrida foi feita utilizando-se a Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio Rad) e tampão de corrida Tris-HCl 0,025M; glicina 0,19M e SDS 0,1%, pH 8,3 a 35 mA e 200V.

Após a corrida, o gel foi submetido à coloração com nitrato de prata. O gel foi colocado em solução fixadora (metanol 50%, ácido acético 12%, formaldeído (37%) 0,05%) por 16 horas e sob agitação leve. Em seguida, foi lavado 3 vezes por 20 minutos com etanol 50% sob agitação leve. Um pré-tratamento foi realizado colocando o gel por 1 minuto rigorosamente em solução de tiosulfato de sódio 0,02%. Em seguida, o gel foi lavado 3 vezes por 20 segundos com água destilada. A impregnação com prata foi feita colocando o gel em uma solução de nitrato de prata (AgNO_3 0,2%, formaldeído 0,075%) por 20 minutos no escuro. Posteriormente, o gel foi lavado 2 vezes com água destilada por 20 segundos. Em seguida, foi colocado em solução reveladora (Na_2CO_3 6%, formaldeído (37%) 0,05%, solução de tiosulfato de sódio 2%) e agitado até a revelação. Após a revelação, o gel foi colocado em solução contendo metanol 50%, ácido acético 12% e armazenado em metanol 50% para análises posteriores.

3.5. Caracterização bioquímica

3.5.1. Dosagem e recuperação proteica

A amostra (rBpSP-I) liofilizada e ressuspendida em PBS foi dosada em espectrofotômetro Biodrop (Analítica), que faz a análise estatística entre 3 leituras: uma a 260 nm, outra a 280 nm e a última a 320 nm, pois os 3 comprimentos de onda são capazes de detectar proteína.

3.5.2. Dot blotting

6 µg da amostra (rBpSP-I) foram aplicados na membrana de nitrocelulose em duplicata, assim como controle negativo BSA 1% em PBS 1X. Após seca, a membrana foi bloqueada com uma solução de bloqueio (TBS 1X-molico 5%, água destilada, Tween 0,05%) por 1 hora sob agitação e em temperatura ambiente. A membrana foi lavada 3 vezes por 1 minuto com uma solução de TBS e Tween 0,05%. Em seguida, a membrana foi incubada com a solução TBS-1X-molico 2% adicionado de 3,7 µL de anticorpo primário anti-His tag (Quiagen)(0,2 mg/mL) por 16 horas em temperatura ambiente. A membrana foi lavada, novamente, 6 vezes por 5 minutos com TBS 1X Tween 0,05%. Posteriormente, a membrana foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente com a solução TBS-1X-molico 1% adicionando 3 µL de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (Invitrogen)(diluição 1:5000) conjugado com peroxidase por 1 hora em temperatura ambiente. A membrana foi lavada, novamente, 6 vezes por 5 minutos com TBS 1X Tween 0,05% e em seguida foi revelada com uma solução de DAB (3,3' diaminobenzidina) (TBS-T-DAB 66,67% com 40 µL de peróxido de hidrogênio 30%) no escuro.

3.6. Caracterização funcional

3.6.1. Atividade coagulante sobre o plasma bovino

O tempo de coagulação foi medido segundo Assakura et al., (1992), com algumas modificações, utilizando-se micro-processador Quick Timer (DRAKE LTDA). 150 µL de plasma bovino foram incubados com 15 µg da serinoprotease recombinante rBpSP-I ou 5 µg da peçonha bruta de *B. moojeni* em 50 µL de tampão Tris-HCl 20mM CaCl₂ 0,25M pH 7. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.6.2. Atividade fibrinogenolítica

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio foi realizada segundo Rodrigues et al., (2000) com algumas modificações. A atividade fibrinogenolítica foi realizada em diferentes

concentrações da proteína recombinante e em diferentes tempos de incubação. Para analisar a quantidade mínima de proteína capaz de degradar o fibrinogênio foram incubadas por 1 hora a 37°C diferentes concentrações (5, 10, 15, 20 e 30 µg) da serinoprotease recombinante em 50 µg de solução de fibrinogênio bovino (1 mg/mL). A partir desse resultado, a menor concentração em que se observou degradação do fibrinogênio foi submetida a análise de tempo de atividade fibrinogenolítica. Dessa maneira, a proteína foi incubada em diferentes tempos (5, 10, 15, 30, 60 e 120 minutos) com 50 µg de fibrinogênio. A solução STOP [(Tris-HCl 0,06 M pH 6,8; SDS 2% (m/v); glicerol 10% (v/v); β-mercaptoetanol 10% (v/v) e azul de bromofenol 0,05% (m/v)] foi adicionada e as amostras aquecidas a 100°C por 5 minutos. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.7. Linhagens celulares

3.7.1. Manutenção da linhagem celular em suspensão (HL-60)

A linhagem HL-60 foi mantida congelada em nitrogênio líquido (-195°C) em alíquotas de 1×10^6 células/mL em solução de congelamento (10% de DMSO – Dimetilsulfoxido e 90% de SBF - soro bovino fetal). Para a realização dos experimentos as células foram descongeladas e cultivadas em monocamada, em frascos de 25 cm² com 5 mL de meio de cultura RPMI (Gibco 31800-022, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco 12657, USA) (SBF). Os frascos contendo as células descongeladas foram incubados em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C, até atingirem o estado de confluência (~ 5×10^6 células), quando necessitam de subcultivo.

3.7.2. Subcultivo da HL-60

Transferiu-se todo o líquido da garrafa de cultura obtido no item anterior, para um tubo cônico de 15 mL. Após essa etapa, o material foi centrifugado 900 xg por 5 min, e em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o pellet de células foi ressuspensionado em RPMI a 10% de SBF. Em seguida foi feita a contagem do número de células em câmara de Neubauer na presença do corante azul de Tripán, depois a suspensão celular foi distribuída em garrafas de 75 cm² de meio de cultura com 10 mL de meio RPMI a 10% de SBF, de modo que cada garrafa recebesse 1×10^6 células. Novamente as garrafas foram incubadas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C, até atingirem o estado de confluência, quando necessitam de novo subcultivo. Os ensaios com a toxina foram executados com células entre o 3° e 6° subcultivo.

3.7.3. Manutenção da linhagem celular aderente (HepG2, MCF-7 e Hek239)

As linhagens HepG2 MCF-7 e Hek239 foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido (-195°C) em alíquotas de 1×10^6 células/mL em solução de congelamento (10% de DMSO e 90% de soro bovino fetal). Para a realização dos experimentos as células foram descongeladas e cultivadas em monocamada, em frascos de 25 cm² com 5 mL de meio de cultura DMEM (Gibco 31600-034, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). Os frascos contendo as células descongeladas foram incubados em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C, até atingirem o estado de confluência ($\sim 5 \times 10^6$ células), quando necessitam de subcultivo.

3.7.4. Subcultivo da HepG2, MCF-7 e Hek239

As linhagens aderentes necessitaram de um procedimento diferente da linhagem em suspensão e semi-aderente. Todo o conteúdo do frasco obtido no item anterior foi desprezado, permanecendo assim, somente as células aderidas ao fundo do frasco. O frasco foi lavado com aproximadamente 2 mL de tampão PBS (Phosphate Buffer Saline – Na₂HPO₄ 3,2 mM; KH₂PO₄ 0,5 mM; KCl 1,3 mM; NaCl 135 mM) estéril pH 7,4 que posteriormente foi descartado. Em seguida, adicionou-se 2 mL de tripsina 0,25% (SAFC Bioscience 59429C, USA) à garrafa de cultura. O período de ação da tripsina é de aproximadamente 5 minutos e após este período, a mesma foi neutralizada com meio DMEM com SBF 10%, de modo que o volume de meio fosse o dobro do volume usado de tripsina. Realizada essa etapa, transferiu-se todo o conteúdo para um tubo falcon de 15 mL e centrifugou-se por 5 min a 900 xg. Desprezou-se todo o sobrenadante, sendo o pellet ressuspensionado em DMEM com SBF 10%. Em seguida, foi feita a contagem do número de células em câmara de Neubauer na presença do corante azul de Tripán, depois a suspensão celular foi distribuída em garrafas 75 cm² com 10 mL de meio de cultura DMEM com SBF 10%, de modo que cada garrafa recebesse 1×10^6 células. Novamente as garrafas foram incubadas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C, até atingirem o estado de confluência, quando necessitam de novo subcultivo. Os ensaios com a toxina foram executados com células entre o 3º e 6º subcultivo.

3.7.5. Extração de células mononucleares de sangue total (PBMC)

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Toxinologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, CEP/FCFRP nº 391, CAAE nº 49861315.5.0000.5403. Foram coletados 10 mL de sangue periférico, em tubos heparinizados, de indivíduo saudável, sem uso de terapia farmacológica, que aceitou participar da pesquisa e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O

sangue foi transferido para um tubo de 50 mL onde foi acrescentado o mesmo volume (~10 mL) de PBS em temperatura ambiente. Após homogeneização cuidadosa, o sangue foi distribuído em 4 tubos, sendo colocados 5 mL dessa solução em cada tudo. A essa mistura, foram acrescentados 5 mL de Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, 10771), que é uma solução contendo polissacarose e diatrizoato de sódio, ajustado a uma densidade de 1,077 g/mL, facilitando a recuperação de um grande número de células mononucleares viáveis (linfócitos), que formam uma camada distinta entre as hemácias e o plasma. Após homogeneização, todo o material foi centrifugado a 756 $\times g$ por 20 min. Após a centrifugação, a fase contendo os linfócitos foi retirada com a ajuda de uma pipeta Pasteur. Estes foram reunidos em um tubo e centrifugados a 900 $\times g$ por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensionado em 5 mL de PBS. Em seguida, o material foi centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente. Novamente, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspensionado com ~ 5 mL de meio RPMI (Gibco, 31800-022) suplementado com 10% de SBF (Gibco, 12657). A contagem do número de células em câmara de Neubauer foi feita na presença do corante Turk, seguido pelo plaqueamento das células e tratamento com PBS ou toxina. As placas foram levadas à estufa a 37°C com 5% de CO₂, até a análise.

3.8. Teste de citotoxicidade

Para o teste de citotoxicidade foram feitos 3 experimentos independentes, em triplicatas, para cada concentração de rBpSP-I. Foram utilizadas placas de 96 poços, em que os 3 primeiros poços foram destinados à leitura do branco e, portanto, não receberam células ou tratamento. O restante dos poços receberam 2×10^4 células/poço, com um volume final de 100 μ L. As células HL-60, HepG2, MCF7, Hek293 e PBMC foram plaqueadas e incubadas por 24 horas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C. As células foram tratadas com 50 μ L de PBS como controle negativo, 50 μ L de cisplatina (Incel - Darrow®) a 0,33 μ g/ μ L como controle positivo ou rBpSP-I em diferentes concentrações (50; 25; 12,5; 6,25; ou 3,125 μ g/mL) e incubadas novamente por 24 horas nas mesmas condições. Após 24 horas, os poços, com exceção dos destinados à leitura do branco, receberam 20 μ L de (MTT) (3-(4,5-dimetil tiazol 2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium)(Sigma M2128, USA) e foram incubados por 3 horas a 37°C e 5% de CO₂. As placas foram, então, centrifugadas a 900 $\times g$ por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado, invertendo-se a placa. Foram adicionados 100 μ L de DMSO (Sigma D2650, USA) em cada poço, mantendo a placa sob agitação até a total dissolução dos cristais. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda 570 nm (MOSMANN, 1983).

4. RESULTADOS

4.1. Expressão da serinoprotease recombinante da glândula de *B. pauloensis*

A expressão da recombinante consistiu, primeiramente, na promoção de rápido crescimento celular, em que a cultura de células foi mantida de glicerol como fonte de carbono durante as fases pré-inóculo (primeira fase) e geração de biomassa (segunda fase). A terceira fase foi caracterizada pela indução da expressão da proteína pela adição de metanol ao meio. Após 0, 24, 48, 72 e 96 horas de indução, o sobrenadante das culturas foi analisado em gel SDS-PAGE a 4-20% e corado com nitrato de prata para visualização da expressão. Conforme mostrado na figura, possivelmente, a rBp-SPI começa a ser expressa a partir de 48 horas. É possível observar na figura uma banda (apontada pela seta) que apresenta massa molecular de aproximadamente 38 kDa, valor que corresponde as massas molares descritas na literatura de serinoproteases.

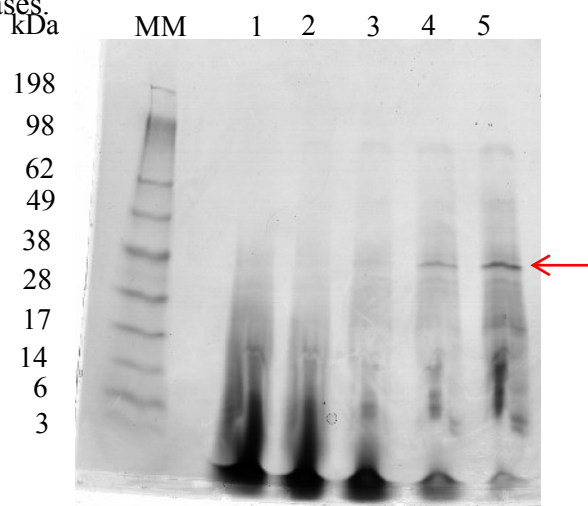


Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida 4-20%. Expressão da rBpSP-I recombinante em levedura *P. pastoris* em meio BMMY pH 7. MM: padrão de massa molecular, 1: 0h, 2: 24h, 3: 48h, 4: 72h, 5: 96h. Foram aplicados 5 μ L do padrão de massa molecular e 20 μ L do sobrenadante de todos os tempos de indução. A seta em vermelho indica a proteína recombinante.

4.2. Purificação da serinoprotease recombinante de *B. pauloensis* em resina de níquel Ni-NTA Superflow

A construção do vetor de expressão da rBpSP-I foi feita de modo que a proteína contivesse uma cauda de poli-histidina na região C-terminal da molécula para facilitar a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade. Com isso, todo o meio de indução foi centrifugado, o sobrenadante filtrado em membrana de 0,22 μ m e aplicado em resina de níquel Ni-NTA Superflow. A eluição foi realizada em gradiente “step wise”, em que 16 frações proteicas foram obtidas. As frações foram submetidas a eletroforese em gel de

poliacrilamida 4-20%, o que possibilitou visualizar a presença da proteína recombinante rBpSP-I nas frações com gradiente de 25 mM a 75 mM de imidazol. As frações em que foi possível observar a presença da proteína recombinante foram reunidas, dialisadas e liofilizadas.

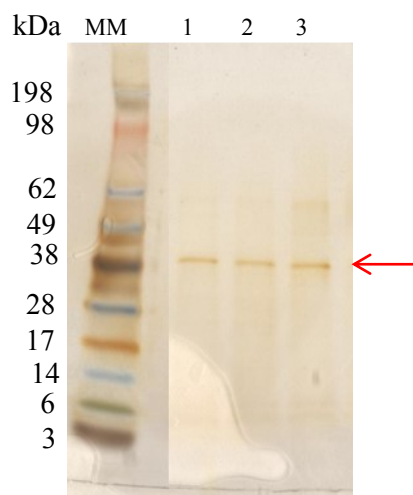


Figura 6. Eletroforese em gel de poliácridamida 4-20%. Perfil de purificação da rBpSP-I em resina de níquel Ni-NTA Superflow. MM: marcador molecular; eluição da proteína nos gradientes 25 (1), 50 (2) e 75 mM (3) de imidazol da cromatografia por afinidade.

4.3. Caracterização bioquímica

4.3.1. Dosagem proteica

A dosagem proteica foi feita em Biodrop, apresentando um rendimento de 1,87 g/L de meio de cultura.

4.3.2. Dot blotting

Para confirmar a presença da proteína recombinante, foi feito ensaio de imunodeteção por *Dot blotting* utilizando anticorpos monoclonais anti-His-tag. Como controle negativo foi utilizado BSA. A proteína purificada foi aplicada em dois pontos da membrana, em que ambos apresentaram reação com o anticorpo monoclonal, indicando a existência da cauda de histidina e, assim, confirmando a presença da proteína recombinante **rBpSP-I**.

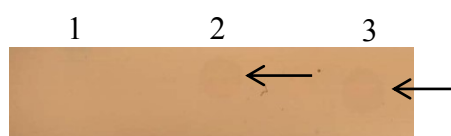


Figura 7. Detecção da rBpSP-I recombinante produzida em *P. pastoris*. Membrana de nitrocelulose contendo as amostras 1: controle negativo (BSA), 2 e 3: rBpSP-I purificada. Amostras incubadas com o anticorpo primário anti-His tag (1:1000) e anticorpo secundário Anti-IgG conjugado com peroxidase (1:5000).

4.4. Caracterização funcional

4.4.1. Atividade coagulante sobre o plasma bovino

A serinoprotease recombinante purificada por cromatografia de afinidade foi avaliada quanto à atividade coagulante sobre o plasma bovino. Foram utilizados 15 µg de rBpSP-I para o ensaio e observamos que a proteína recombinante foi capaz de coagular o plasma bovino em 85 segundos (Figura 8). 5 µg de peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foram utilizados como controle positivo e foi capaz de coagular o plasma bovino em 30 segundos. Como controle negativo foi utilizado PBS que não coagulou o plasma bovino.



Figura 8. Coágulo formado em 85 segundos após incubação de 15 µg de rBpSP-I com plasma bovino a 37°C.

4.4.2. Atividade fibrinogenolítica

A atividade fibrinogenolítica da proteína recombinante foi avaliada por SDS-PAGE 12,5% pela visualização da degradação das cadeias A α , B β e κ do fibrinogênio bovino. Podemos observar (Figura 9) que em 60 minutos 5 µg da serinoprotease não foi capaz de degradar o fibrinogênio, enquanto que com 10 µg, 15 µg, 20 µg e 30 µg de proteína houve degradação da cadeia A α do fibrinogênio.

As setas pretas indicam as cadeias A α , B β e κ do fibrinogênio. A seta em vermelho mostra a banda de aproximadamente 38 kDa, valor que corresponde as massas molares descritas na literatura de serinoproteases e, possivelmente, a massa da rBpSP-I. É possível observar, também, outras bandas na parte inferior do gel que representam os produtos de degradação do fibrinogênio.

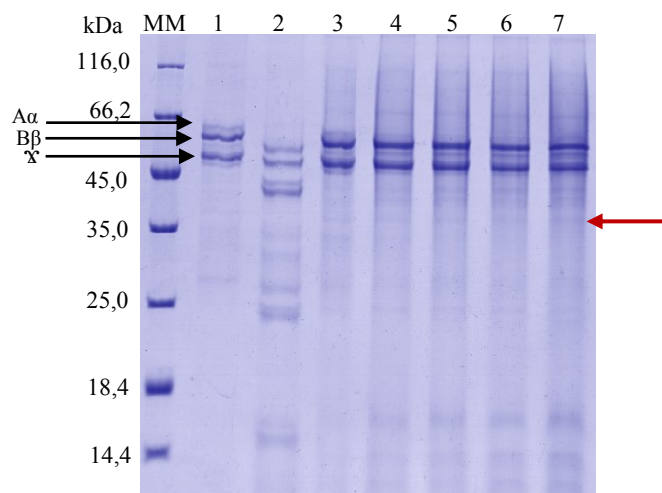


Figura 9. Atividade fibrinogenolítica da serinoprotease recombinante em gel de poliacrilamida a 12,5%. Diferentes concentrações de rBpSP-I foram incubados com 50 µg de fibrinogênio bovino (1mg/mL) a 37°C por 1 hora. 1: Fibrinogênio bovino (50 ug); 2: peçonha bruta de *Bothrops moojeni*; 3: rBpSP-I (5 µg); 3: rBpSP-I (10 µg); 3: rBpSP-I (15 µg); 3: rBpSP-I (20 µg); 3: rBpSP-I (30 µg).

A partir do resultado anterior da atividade fibrinogenolítica da serinoprotease recombinante, um novo experimento foi realizado de maneira tempo dependente fixando a menor concentração em que houve degradação do fibrinogênio. 10 µg da proteína foram incubados com fibrinogênio a 37°C durante 5, 10, 30, 60 e 120 minutos. Podemos observar pela Figura 10 que há degradação da cadeia Aα do fibrinogênio a partir de 10 minutos. A clivagem do fibrinogênio pode ser confirmada a partir da visualização das bandas indicadas pela seta verde, que mostram os prováveis produtos de degradação. A seta vermelha indica bandas de aproximadamente 38 kDa e, provavelmente, a serinoprotease recombinante.

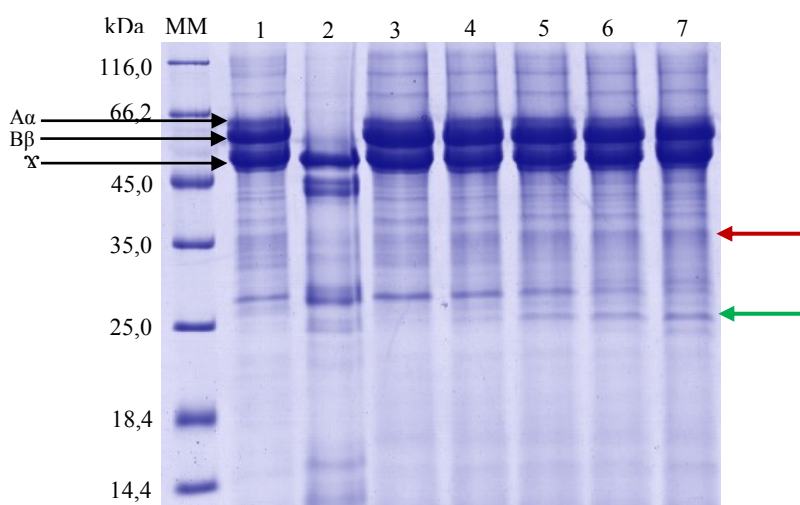


Figura 10. Atividade fibrinogenolítica da serinoprotease recombinante em gel de poliacrilamida a 12,5%. 10 µg de rBpSP-I foram incubados com 50 µg de fibrinogênio bovino (1mg/mL) a 37°C de forma tempo dependente.

MM- marcador molecular; 1- Fibrinogênio bovino controle; 2- peçonha bruta de *Bothrops moojeni*; 3- 5'; 4- 10'; 5- 30'; 6- 1h e 7- 2h.

4.5. Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade da proteína recombinante sobre células normais e células tumorais foi avaliada através do ensaio de MTT, em que as células Hek293, PBMC, HL-60, HepG2 e MCF7 foram plaqueadas e incubadas por 24 horas em estufa e posteriormente tratadas com diferentes concentrações da serinoprotease recombinante (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 $\mu\text{g/mL}$).

Os resultados indicam que a proteína recombinante apresentou baixa citotoxicidade às células não tumorais Hek293 e PBMC. Nos ensaios com Hek293, foi observada 19,11% de citotoxicidade com tratamento de 50 $\mu\text{g/mL}$ de proteína; 17,13% com 25 $\mu\text{g/mL}$, 16,97% com 12,5 $\mu\text{g/mL}$ e no tratamento com 3,124 $\mu\text{g/mL}$ a citotoxicidade não foi significativa em relação ao controle negativo (Figura 11a). Da mesma maneira, nos testes com PBMC a proteína teve baixa citotoxicidade, sendo que apenas com tratamento a 6,25 $\mu\text{g/mL}$ de serinoprotease foi observada citotoxicidade (10,52%). Nas outras concentrações a citotoxicidade em relação ao controle negativo não foi significativa (Figura 11b).

Os resultados dos testes com células tumorais mostraram que a serinoprotease recombinante apresentou citotoxicidade nas linhagens estudadas. Quando tratada com 50 $\mu\text{g/mL}$ de proteína de recombinante, foi observada 31,05% de citotoxicidade frente a HL-60 (Figura 11c). Já no tratamento de 25 $\mu\text{g/mL}$, observa-se a maior citotoxicidade para esse tipo celular, de 34,74%. Em menores concentrações, a citotoxicidade diminuiu, 22,97% para 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de tratamento, 21,54% para 6,25 $\mu\text{g/mL}$ e 16,03% com tratamento de 3,125 $\mu\text{g/mL}$, que não foi significativo.

A proteína também se mostrou citotóxica a HepG2 (Figura 11d), com 33,4% de citotoxicidade para tratamento de 50 $\mu\text{g/mL}$. Assim como no teste com HL-60, a maior citotoxicidade foi observada no tratamento com 25 $\mu\text{g/mL}$, em que 37,33% das células morreram. Com tratamento de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ e 6,25 $\mu\text{g/mL}$ de recombinante, o número de células vivas diminuiu de forma similar em aproximadamente 21,93%, enquanto que com tratamento de 3,125 $\mu\text{g/mL}$ a citotoxicidade aumentou para 22,41%.

A maior citotoxicidade da serinoprotease recombinante foi observada nos testes com MCF7 (Figura 11e), com 36,29% de morte celular com tratamento de 6,25 $\mu\text{g/mL}$. Nos outros tratamentos, a citotoxicidade também foi significativa, com 34,3% de morte para tratamento de 50 $\mu\text{g/mL}$, 31,72% para 25 $\mu\text{g/mL}$, 31,37% para 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de tratamento e 29,31% de citotoxicidade para tratamento com 3,125 $\mu\text{g/mL}$ de proteína.

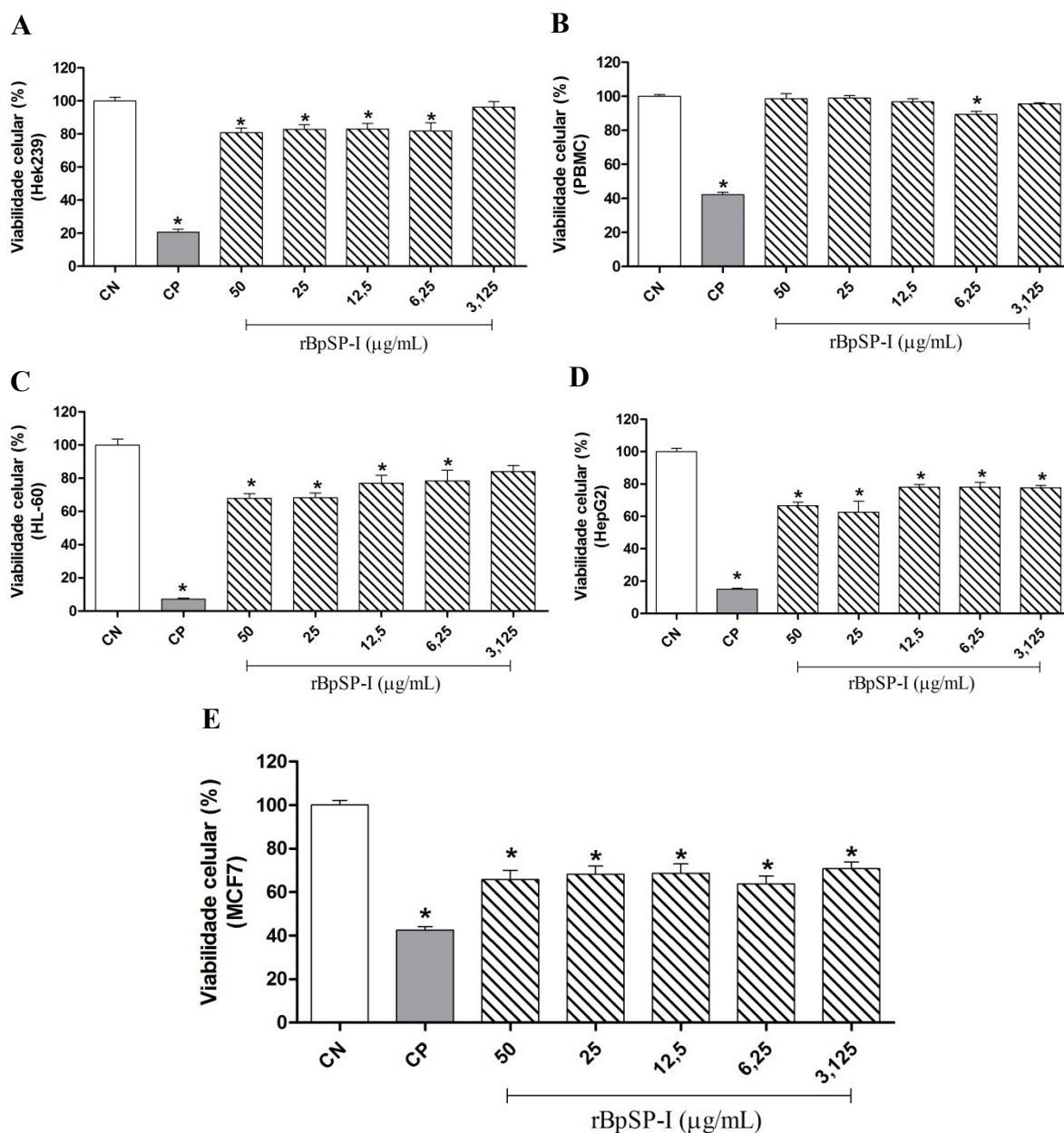


Figura 11. Análise de citotoxicidade da rBpSP-I em Hek293 (A), PBMC (B), HL-60 (C), HepG2 (D) e MCF7 (E), por teste de MTT. As culturas de células foram tratadas com diferentes concentrações da serinoprotease (50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 µg/mL) por 24h.

5. DISCUSSÃO

A família Viperidae apresenta uma peçonha composta por diversas moléculas como metaloproteases, fosfolipases A₂, serinoproteases, L-aminoácido oxidases, hialuronidases e outras substâncias (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006). Diversas toxinas isoladas da peçonha são utilizadas para fins farmacêuticos devido à ação antimicrobiana, antiviral, antiparasitária, antifúngico e interferência em patologias vasculares (PASSERO et al., 2007; MULLER et al., 2012; HUBBARD et al., 2012;

CASTILLO et al., 2012; YAMANE et al., 2013; SAMY et al., 2012; KOH et al., 2012; WEN et al., 2013).

Para elucidar o funcionamento e mecanismo de ação dessas proteínas, pesquisadores purificam a peçonha, obtendo baixo rendimento e submetendo o animal a uma situação de estresse. Desta maneira, o uso da tecnologia da expressão heteróloga possibilita a obtenção de grandes quantidades de proteínas funcionais, além de diminuir a necessidade da manipulação do animal (MAEDA et al., 1991; YU et al., 2007). As SVSPs são proteínas que possuem em sua estrutura glicosilação e pontes dissulfeto. Dessa maneira, para a expressão heteróloga dessas serinoproteases, é importante a escolha de um sistema de expressão eucariótico que realize tais modificações pós-traducionais (HORVAT; ZOLDOŠ; LAUC, 2011).

A expressão da serinoprotease recombinante foi analisada em SDS-PAGE 4-20% e foi possível observar que a proteína começou a ser expressa após 48 horas de indução com metanol. A cultura foi centrifugada e o sobrenadante submetido a cromatografia de afinidade. A cauda contendo seis resíduos de histidina na região C-terminal da proteína recombinante permitiu a interação da serinoprotease com a resina Ni-NTA, auxiliando o processo de purificação. A partir dos resultados observados no gel de poliacrilamida, foi possível observar que a proteína é eluída com a passagem dos gradientes de 25 mM, 50 mM e 75 mM de imidazol. Foi observado, também, uma pequena quantidade de proteína eluída no momento em que a amostra era aplicada à cromatografia, o que pode ter acontecido devido a saturação da resina de níquel (resultado não mostrado). Dessa maneira, um novo processo de purificação foi realizado a fim de resgatar essa massa de proteína que seria perdida.

O ensaio de dot blotting para confirmação da presença da serinoprotease recombinante utilizando um anticorpo primário anti-his tag, que interage com a cauda de histidina da proteína, e um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, que é responsável pela quimioluminescência. Dessa maneira, foi possível detectar a proteína recombinante.

Após a purificação e confirmação da presença da serinoprotease recombinante, foram feitos ensaios de caracterização funcional da proteína. As SVTLs tem ação semelhante a tripsina, ou seja, promovem a formação de coágulos ao clivar e liberar os fibrinopeptídeos presentes na estrutura do fibrinogênio. Essas proteínas podem liberar o fibrinopeptídeo A, B ou ambos (CASTRO et al., 2004). Entretanto, a maior parte das SVTLs tem preferência por clivar apenas uma cadeia (PIRKLE, 1998). Foi avaliada a capacidade da rBpSP-I de clivar o fibrinogênio e foi constatada ação proteolítica da recombinante especificamente sobre a cadeia A α do fibrinogênio. A menor concentração da proteína que apresentou atividade

fibrinogenolítica foi 10 µg. Essa concentração foi, então, analisada sobre o fibrinogênio de forma tempo dependente, em que foi possível observar a degradação da cadeia Aα a partir de 10 minutos de incubação, o que pode ser confirmado pela presença de bandas ausentes no fibrinogênio. Dessa maneira, a serinoprotease recombinante pode ser classificada como SVTL-A, assim como flavoxobin, isolada de *Trimeresurus flavoridis* (YAMAMOTO et al., 2002) e BbrzSP-32, isolada da peçonha de *Bothrops brazili* (ZAQUEO et al., 2016), que clivam preferencialmente a cadeia Aα do fibrinogênio. Além disso, foi possível observar uma banda de 38 kDa, massa característica de serinoproteases, que, provavelmente, indica a presença da proteína recombinante.

Foi avaliada, também, a atividade coagulante da serinoprotease, em que a rBpSP-I foi capaz de coagular o plasma bovino *in vitro*. A serinoprotease nativa BpSP-I coagula o plasma bovino em dose mínima de 1,3 µg (COSTA et al., 2009). As enzimas thrombin-like são capazes de coagular o plasma sanguíneo por clivarem as cadeias Aα e Bβ do fibrinogênio, o que leva a liberação dos monômeros insolúveis de fibrina. Entretanto, as SVTLs não ativam o fator XIII da cascata de coagulação, o que impossibilita as ligações cruzadas entre os monômeros de fibrina, levando a formação de um coágulo “frouxo”, facilmente degradado (CASTRO et al., 2004). Dessa maneira, em 85 segundos de reação entre o plasma bovino e 15 µg da serinoprotease recombinante, foi observado a formação de um coágulo de fácil degradação (Figura 8).

Foram descritas na literatura diversos compostos isolados de peçonha de serpentes que apresentam ação sobre células tumorais. Os mecanismos variam entre inibição da agregação plaquetária, da proliferação e da adesão celular, indução da apoptose, diminuição do volume tumoral e alteração da viabilidade de células tumorais (CHIANG; YANG; HUANG, 1996; DEBNATH et al., 2010). Foi avaliada, então, a citotoxicidade da serinoprotease recombinante sobre células não-tumorais (Hek293 e PBMC) e tumorais (HL-60, HepG2 e MCF7).

De acordo com os resultados, a rBpSP-I apresentou citotoxicidade significativa frente a linhagem MCF7, em todas as condições de tratamento. A citotoxicidade com maior valor foi observada a 3,125 µg/mL após 24h de tratamento com 36,29% de citotoxicidade. Entretanto, não foi observado um padrão de citotoxicidade da proteína recombinante em relação a concentração dos tratamentos. Dessa maneira, o maior valor de citotoxicidade da proteína em relação a HL-60 foi observado a 25 µg/mL de tratamento, com 34,74% de citotoxicidade, assim como os testes com HepG2, que apresentaram 37,33% de citotoxicidade para essa concentração de tratamento.

Apesar da proteína recombinante ter apresentado importante atividade citotóxica em células tumorais, não houve citotoxicidade significativa da recombinante em células não tumorais PBMC. Já nos testes com Hek293, foi observada 19,11% de citotoxicidade com tratamento de 50 µg/mL de proteína recombinante. Nos outros tratamentos, foi observada baixa morte celular. Esses resultados podem sugerir que o mecanismo de ação dessa proteína seja direcionado a células cancerígenas.

6. CONCLUSÃO

A expressão da proteína recombinante através do sistema de expressão *P. pastoris* e permitiu a obtenção e purificação eficaz da serinoprotease funcional, com atividade coagulante e fibrinogenolítica.

rBpSP-I apresentou citotoxicidade significativa frente às células tumorais MCF7, HL-60 e HepG2. Todavia, a proteína mostrou baixa citotoxicidade às células não tumorais Hek293 e PBMC. A partir deste estudo, pode-se sugerir que a proteína recombinante possa ser utilizada em ensaios com células tumorais. Entretanto, mais estudos devem ser feitos para comparar o efeito citotóxico de serinoproteases nativas com o da recombinante e para compreender o mecanismo de ação que levou à morte dessas linhagens tumorais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AL-ASMARI, A. et al. Snake venom causes apoptosis by increasing the reactive oxygen species in colorectal and breast cancer cell lines. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 9, p. 6485-6498, 2016.

AMICONI, G. et al. A novel venombin B from *Agkistrodon contortrix contortrix*: evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from thrombin. **Biochemistry**, v. 39, n. 33, p. 10294-308, 2 ago. 2000.

ASSAKURA, M.; DE FURTADO, M.; MANDELBAUM, F. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, p. 727-732, 1992

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

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Families and clans of serine peptidases. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 318, n. 2, p. 247-50, 4 abr. 1995.

BATISTA, D.; MATTOS, M.; DA SILVA, S. Convivendo com o câncer: do diagnóstico ao tratamento. **Revista de Enfermagem da UFSM**, 2015.

BAZAA, A. et al. MVL-PLA₂, a phospholipase A₂ from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits tumor cells adhesion and migration. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 28, n. 4, p. 188-93, 5 maio 2009.

BÉRNILS, R.S.; COSTA, H.C. Répteis brasileiros: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**. v. 4 (3), p. 75-93, 2005.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Expression of a new serine protease from *Crotalus durissus collilineatus* venom in *Pichia pastoris* and functional comparison with the native enzyme. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 23, p. 9971-86, 2 dez. 2015.

BORTOLETO, R. K. et al. Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 40, n. 9, p. 1307-12, set. 2002.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 851-9, 6 jan. 2000.

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

CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **Journal of mass spectrometry : JMS**, v. 42, n. 11, p. 1405-14, 4 nov. 2007.

CARDOSO et al. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2003.

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

CASTRO, H. C. et al. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 61, n. 7-8, p. 843-56, 4 abr. 2004.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 45-66, 6 jan. 2000.

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

CIDADE, D. et al. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: Analysis of the gene expression pattern. **Toxicon**, p. 437-461, 2006.

CONLON, M. et al. Cytotoxic peptides with insulin- releasing activities from skin secretions of the Italian stream frog *Rana italica* (Ranidae). **Journal of Peptide Science**, 2017.

COSTA, F. et al. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 725-735, 2009.

DEBNATH, A. et al. A lethal cardiotoxic-cytotoxic protein from the Indian monocellate cobra (*Naja kaouthia*) venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 56, n. 4, p. 569-79, 3 set. 2010.

DEKAN, Z. et al. Δ- Myrtoxin- Mplα is a Helical Heterodimer from the Venom of the Jack Jumper Ant that has Antimicrobial, Membrane- Disrupting, and Nociceptive Activities. **Angewandte Chemie**, p. 8615-8619, 2017.

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

FENARD, D. et al. Secreted phospholipases A(2), a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 104, n. 5, p. 611-8, 3 set. 1999.

FERREIRA, S. H. A BRADYKININ-POTENTIATING FACTOR (BPF) PRESENT IN THE VENOM OF *Bothrops jararaca*. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 24, p. 163-9, 1 fev. 1965.

GARRAWAY, L.; LANDER, E. Lessons from the Cancer Genome. **Cell**, p. 17-37, 2013.

GEBRIM, L. C. et al. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. **Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization**, v. 37, n. 4, p. 222-9, 6 ago. 2009.

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

GUTIÉRREZ, J. et al. Skeletal Muscle Necrosis and Regeneration after Injection of BaH1, A Hemorrhagic Metalloproteinase Isolated from the Venom of the Snake *Bothrops asper* (*Terciopelo*). **Experimental and Molecular Pathology**, p. 28-41, 1995.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HENRIQUES, E. S.; FONSECA, N.; RAMOS, M. J. On the modeling of snake venom serine proteinase interactions with benzamidine-based thrombin inhibitors. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 13, n. 9, p. 2355-69, 3 set. 2004.

HORVAT, T.; ZOLDOŠ, V.; LAUC, G. Evolutional and clinical implications of the epigenetic regulation of protein glycosylation. **Clinical epigenetics**, v. 2, n. 2, p. 425-32, 1 ago. 2011.

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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. 2015. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>. Acesso em: 17/04/2017.

ITOH et al. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **The Journal of biological chemistry**, p. 3132-5, 1987.

JIANG, N. et al. Advances in mitotic inhibitors for cancer treatment. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 6, n. 8, p. 885-95, 2 ago. 2006.

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

KINI, M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, p. 827-840, 2003.

KISIEL. Molecular properties of the Factor V-activating enzyme from Russell's viper venom. **The Journal of biological chemistry**, p. 12230-4, 1979.

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

LESK, A. M.; FORDHAM, W. D. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. **Journal of molecular biology**, v. 258, n. 3, p. 501-37, 5 maio 1996.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 10, p. 790-802, 3 out. 2003.

LI, P. et al. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 105-124, 2007.

LIN, Y. et al. Expression and functional characterization of chitribrisin, a thrombin-like enzyme, in the venom of the Chinese green pit viper (*Trimeresurus albolabris*). **Protein expression and purification**, v. 67, n. 1, p. 48-52, 2 set. 2009.

LU, Q.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, J. K. Snake venoms and hemostasis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 8, p. 1791-1799, 2005.

MAEDA, M. et al. Expression of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **Journal of biochemistry**, v. 109, n. 4, p. 632-7, 1 abr. 1991.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 36, n. 12, p. 1749-800, 2 dez. 1998.

MARRAKCHI, N. et al. Cerastocytin, a new thrombin-like platelet activator from the venom of the Tunisian viper *Cerastes cerastes*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, p. 147-156, 1995.

MARTINES, M. et al. Effects of Schizolobium parahyba extract on experimental *Bothrops* venom-induced acute kidney injury. **PloS one**, p. e86828, 2014.

MARTÍNEZ, J. L. L. et al. Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 965-71, 6 dez. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acidentes por animais peçonhentos**. Guia de Vigilância em Saúde, p. 719-738, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS – Sinan Net. **Acidente por animais peçonhentos – Notificações registradas no sistema de informação de agravos de notificação – Brasil**.

Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/animaisbr.def>>.

Acesso em: 21/07/2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 5 dez. 1983.

MUANPASITPORN, C.; ROJNUCKARIN, P. Expression and characterization of a recombinant fibrinogenolytic serine protease from green pit viper (*Trimeresurus albolabris*) venom. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 49, n. 8, p. 1083-9, 5 jun. 2007.

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

OUYANG, C.; TENG, C.-M.; HUANG, T.-F. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**, v. 30, n. 9, p. 945-966, 1992.

PARRY, M. A. et al. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. **Structure (London, England : 1993)**, v. 6, n. 9, p. 1195-206, 2 set. 1998.

PASSERO, L. F. et al. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus ssp.* venoms. **Parasitology research**, v. 101, n. 5, p. 1365-71, 1 out. 2007.

PATRICK, D. L. et al. National Institutes of Health State-of-the-Science Conference Statement: Symptom management in cancer: pain, depression, and fatigue, July 15-17, 2002. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, n. 32, p. 9-16, 4 jan. 2004.

PHILLIPS, D.; SWENSON, S.; MARKLAND, F. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. p. 139-154, 2009.

PIRKLE. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. Scientific and Standardization Committee's Registry of Exogenous Hemostatic Factors. **Thrombosis and haemostasis**, p. 675-83, 1998.

PORRO, D. et al. Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts: when are these systems better than bacterial production systems? **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 939-48, 2 fev. 2011.

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

RESÉNDIZ-CARDIEL, G.; ARROYO, R.; ORTEGA-LÓPEZ, J. Expression of the enzymatically active legumain-like cysteine proteinase TvLEGU-1 of *Trichomonas vaginalis* in *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**, 6 abr. 2017.

RIBEIRO, L.; JORGE, M. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 475-480, 1997.

RODRIGUES, R. S. et al. Snake venom phospholipases A2: a new class of antitumor agents. **Protein and peptide letters**, v. 16, n. 8, p. 894-8, 4 jan. 2009.

RODRIGUES, R. S. et al. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 9, p. 2707-20, 4 maio 2012.

RODRIGUES, V. et al. *Bothrops pauloensis* snake venom toxins: the search for new therapeutic models. **Current topics in medicinal chemistry**, p. 670-84, 2015.

ROSENFELD, G.; KELEN, E. M. Cross neutralization of the coagulant activity of some snake venoms by antivenins. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxicology**, v. 4, n. 1, p. 7-15, 3 jun. 1966.

ROSING, J. et al. Factor V activation and inactivation by venom proteases. **Haemostasis**, v. 31, n. 3-6, p. 241-6, 1 jan. 2001.

SAMY, R. P. et al. Snake venom phospholipases A(2): a novel tool against bacterial diseases. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 36, p. 6150-62, jan. 2012.

SANCHEZ, E. et al. A novel fibrinolytic metalloproteinase, barnettlysin-I from *Bothrops barnetti* (Barnett's pitviper) snake venom with anti-platelet properties. **Biochimica et biophysica acta**, p. 542-56, 2015.

SANTUSSI, W. M. et al. Antifungal Activity against Filamentous Fungi of Ts1, a Multifunctional Toxin from Tityus serrulatus Scorpion Venom. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 984, jan. 2017.

SCHONI, R. The use of snake venom-derived compounds for new functional diagnostic test kits in the field of haemostasis. **Pathophysiology of haemostasis and thrombosis**, v. 34, n. 4-5, p. 234-40, 6 jan. 2005.

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

SERRANO, S.; MAROUN, R. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115-1132, 2005.

SÁNCHEZ, E. E. et al. Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. **Archives of toxicology**, v. 83, n. 3, p. 271-9, mar. 2009.

TOKUNAGA et al. The factor V-activating enzyme (RVV-V) from Russell's viper venom. Identification of isoproteins RVV-V alpha, -V beta, and -V gamma and their complete amino acid sequences. **The Journal of biological chemistry**, p. 17471-81, 1988.

ULLAH, A. et al. Crystal structure of Jararacussin-I: the highly negatively charged catalytic interface contributes to macromolecular selectivity in snake venom thrombin-like enzymes. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 22, n. 1, p. 128-32, 2 jan. 2013.

- VALDUJO, P.; NOGUEIRA, C.; MARTINS, M. Ecology of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, p. 169-176, 2002.
- VALLE, A.L.; BRITES, V.L.C. Nomes populares e aspectos ecológicos de *Bothrops pauloensis* (Amaral, 1925) em áreas antropizadas do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 10(2), p. 155-161, 2003.
- VITA, D. et al. The new European gold standard treatment for rectum cancer. **Tumori**, p. S26-9, 2000.
- VYAS, V. et al. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 2, p. 156-162, 2013.
- WEI, L. et al. Identification and Characterization of the First Cathelicidin from Sea Snakes with Potent Antimicrobial and Anti-inflammatory Activity and Special Mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, p. 16633-16652, 2015.
- WEN, Y. et al. Antibacterial and membrane- damaging activities of β - bungarotoxin B chain. **Journal of Peptide Science**, p. 1-8, 2013.
- YAMAMOTO, C. et al. Flavoxobin, a serine protease from *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake) venom, independently cleaves Arg726-Ser727 of human C3 and acts as a novel, heterologous C3 convertase. **Immunology**, v. 107, n. 1, p. 111-7, set. 2002.
- YAMANE, E. et al. Unraveling the antifungal activity of a South American rattlesnake toxin crotamine. **Biochimie**, p. 231-240, 2013.
- YANG, D. et al. Expression, purification and characterization of *Gloydius shedaoensis* venom glosedobin as Hsp70 fusion protein in *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**, v. 66, n. 2, p. 138-42, 6 ago. 2009.
- YANG, R.-S. S. et al. Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 5, p. 661-9, 5 abr. 2005.
- YONAMINE, C. M. et al. Cloning of serine protease cDNAs from *Crotalus durissus terrificus* venom gland and expression of a functional Gyroxin homologue in COS-7 cells. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 54, n. 2, p. 110-20, 6 ago. 2009.
- YOU, W.-K. et al. Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin- like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. **FEBS Letters**, p. 67-73, 2004.
- YU, X. et al. Expression and purification of ancrod, an anticoagulant drug, in *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**, v. 55, n. 2, p. 257-61, 1 out. 2007.
- ZACHARSKI, L.R.; MEEHAN, K.R.; ALGARRA, S.M.; CALVO, F.A. Clinical trials with anticoagulant and antiplatelet therapies. **Cancer Metast. Rev.**, v. 11, p. 421 -431, 1992.

ZAQUEO, K. D. et al. BbrzSP-32, the first serine protease isolated from *Bothrops brazili* venom: Purification and characterization. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 195, p. 15-25, maio 2016.

ZENG, F. et al. Crystal structure and activating effect on RyRs of AhV_TL-I, a glycosylated thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* snake venom. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 3, p. 535-545, 2013.

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

ZHAO, X.; HONG, H.; WU, Z. Efficient extracellular expression of transpeptidase sortase A in *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**, v. 133, p. 132-138, 3 mar. 2017.