

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Clonagem da sequência codificante da Bhalternina, uma serinoprotease de *Bothrops alternatus* (Urutu), para expressão na levedura *Pichia pastoris*

Gabriela Borges Cherulli Colichio

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

Uberlândia – MG

Julho – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Clonagem da sequência codificante da Bhalternina, uma serinoprotease de *Bothrops alternatus* (Urutu), para expressão na levedura *Pichia pastoris*

Gabriela Borges Cherulli Colichio

Jonny Yokosawa

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

Uberlândia – MG

Julho - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Clonagem da sequência codificante da Bhalternina, uma serinoprotease de *Bothrops alternatus* (Urutu), para expressão na levedura *Pichia pastoris*

Gabriela Borges Cherulli Colichio

Jonny Yokosawa

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

Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG

Julho - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Clonagem da sequência codificante da Bhalternina, uma serinoprotease de *Bothrops alternatus* (Urutu), para expressão na levedura *Pichia pastoris*

Gabriela Borges Cherulli Colichio

Aprovado pela Banca Examinadora em: __/__/__ Nota: ____

Jonny Yokosawa

Uberlândia, de de

Dedico o presente trabalho a todos os professores do curso de Biotecnologia, ao meu orientador, aos familiares, amigos e a todos aqueles que de certa forma contribuíram para a realização desse projeto

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a todos os professores que auxiliaram durante o decorrer do curso e contribuíram para minha formação. Muitos foram referência para minha formação profissional, não somente por terem me apresentado novos conhecimentos, mas por terem me feito aprender.

Aos colegas de curso, que, ao longo desses anos, fizeram parte dessa trajetória, dividindo momentos de descontração, estudos, experiências e conquistas. Vocês também fizeram parte da minha formação.

Em especial, agradeço ao professor orientador Jonny Yokosawa pela convivência, oportunidade, apoio e confiança.

A todos que fizeram parte da minha formação como pessoa e como biotecnologista, o meu muito obrigada.

RESUMO

A Bhalternina é uma serinoprotease isolada da peçonha de *Bothrops alternatus* e apresenta atividade proteolítica que afeta a coagulação sanguínea. Purificar essa proteína da peçonha da serpente depende de um processo complexo e a quantidade obtida é restrita. Portanto, o objetivo deste trabalho é a clonagem e obtenção do clone de levedura para a expressão da enzima Bhalternina. Primeiramente foi realizado a construção do plasmídeo com a sequência que codifica a enzima, obtendo o clone de bactéria que o contém. Esse plasmídeo foi utilizado para a obtenção do clone de levedura para futura expressão heteróloga da proteína. Neste trabalho, foi possível obter o clone da levedura *Pichia pastoris* com o gene que expressa a Bhalternina. O resultado da PCR confirmou que o clone apresentou o DNA que codifica a proteína de interesse, possibilitando a continuidade do estudo, em etapa futura, com experimentos de expressão da proteína no sistema de levedura.

Palavras-chaves: clonagem; serinoprotease; expressão heteróloga.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1- Acidentes ofídicos	1
1.2- Peçonhas de serpentes.....	1
1.3- Hemostasia e coagulação sanguínea	2
1.4- Compostos biologicamente ativos e suas aplicações.....	3
1.5- Classificação das enzimas presentes em peçonhas	4
1.6- Serinoproteases.....	5
1.7- Bhalternina	5
1.8- Expressão heteróloga de proteínas	7
1.9- Justificativa	7
2. Objetivos	9
2.1. Objetivos gerais	9
2.2. Objetivos específicos	9
3. Material e métodos	9
3.2. Obtenção do fragmento que codifica a Bhalternina	9
3.3. Obtenção do vetor pPICZα A	11
3.4. Construção do plasmídeo pPICZα A + BH1.....	12
3.5. Linearização do plasmídeo pPICZα A + BH1	13
3.6. Transformação de células competentes por eletroporação	13
3.7. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	15
3.8. Sequenciamento do DNA pPICZα A + BH1	16
3.9. Purificação das colônias de levedura por estrias de esgotamento	16
4. Resultados	17

5. Discussão e conclusão	28
6. Referências	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo 3D teórico da Bhalternina (P0CG03) gerado pela técnica baseada em homologia.....	6
Figura 2 - Esquema do DNA pPICBH1	10
Figura 3 - Esquema do vetor pPICZ α	11
Figura 4 - Parte da sequência do vetor pPICZ α A	12
Figura 5 - Esquema do plasmídeo pPICZ α A + BH1	13
Figura 6 - Esquema do DNA pPUC 19.....	14
Figura 7 - Gel de eletroforese dos plasmídeos pPICBH1 e pPICZ α A isolados.....	17
Figura 8 - Gel de eletroforese dos fragmentos do pPICBH1 digerido.....	18
Figura 9 - Gel de eletroforese para identificar os DNAs purificados.	18
Figura 10 - Eletroforese da ligação do vetor com o fragmento de interesse BH1	19
Figura 11 - Colônias de bactérias transformadas cultivadas em placas de meio LB (baixa concentração de sal) com Zeocina	20
Figura 12 - Eletroforese para confirmação do fragmento de interesse nas bactérias transformadas	21
Figura 13 - Eletroforese posterior à digestão	22
Figura 14 - Primers utilizados nos sequenciamentos	22
Figura 15 - Eletroferograma do primeiro sequenciamento das colônias de bactérias transformadas	23
Figura 16 - Alinhamentos das sequências do primeiro sequenciamento	24
Figura 17 - Parte do eletroferograma do sequenciamento	25
Figura 18 - Gel de eletroforese das amostras pPaABH9 e pPICZ α A.....	26

Figura 19 - Colônias de leveduras transformadas cultivadas em placas de meio YPDS com Zeocina	26
Figura 20 - Gel de eletroforese do DNA extraído das colônias de levedura transformadas	27

LISTA DE ABREVIATURAS

- 1.** CD39 - Ecto-ADPase
- 2.** NO - Óxido Nítrico
- 3.** PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- 4.** PGI2 - Prostaciclina
- 5.** TLE - Trombina-símile

1- INTRODUÇÃO

1.1- Acidentes ofídicos

Os acidentes causados por animais peçonhentos no Brasil têm aumentado principalmente com o desequilíbrio ecológico causado pelo desmatamento e alterações climáticas que ocorrem ao longo dos anos. O crescimento urbano aliado a esses fatores gera sobreposição de espaço entre o homem e esses animais que buscam abrigo e alimento nesse mesmo ambiente (MACHADO, 2016).

Dentre esses acidentes, o ofidismo é o principal deles, pela sua gravidade e frequência. A maioria dos acidentes ofídicos no Brasil é causada por serpentes do gênero *Bothrops*, com mais de 60 espécies encontradas. As principais espécies são *B. alternatus*, *B. atrox*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. jararacuçu* e *B. moojeni*. Estas espécies são encontradas principalmente nas áreas Centro-oeste até o Sul, Amazônia, Nordeste, Sudeste, Sul e Sudeste e Cerrados, respectivamente (BRASIL, 2009).

1.2- Peçonhas de serpentes

Peçonhas de serpentes são secreções que apresentam uma complexa mistura de compostos biologicamente ativos que são íons e biomoléculas, principalmente proteínas com atividade enzimática (JIMÉNEZ-PORRAS, 1970). Essas substâncias são utilizadas, para a defesa ou imobilização das presas, sendo específicas e variáveis de acordo com a espécie, idade, sexo, nutrição e regiões geográficas distintas (GOMES et al., 2010).

Quando inoculado no organismo, o quadro clínico pode ser caracterizado por dois tipos de manifestações, sendo elas locais ou sistêmicas. As manifestações locais são descritas por dor, edema, equimoses e sangramentos no ponto da picada, podendo apresentar

tratamento ganglionar e bolhas acompanhados ou não de necrose (BRASIL, 2001). Além disso, podem ocorrer manifestações sistêmicas como sangramentos em pele e mucosas, hematúria, hematêmese e hemorragia em outras cavidades (BRASIL, 2014).

As ações da peçonha são causadas pela interação de vários componentes, como hiluronidase, metaloproteases e serinoproteases (CALVETE, 2010). Nos últimos 150 anos, foram geradas muitas literaturas sobre a identificação e caracterização de biomoléculas de peçonhas, principalmente enzimas relacionadas com a agregação plaquetária (SWENSON; MARKLAND, 2005).

1.3- Hemostasia e coagulação sanguínea

A circulação sanguínea é essencial para a vida e a integridade desse processo é crucial para a sobrevivência dos organismos. Esse sistema fechado necessita estar regulado pela interação da agregação plaquetária, coagulação do sangue e vasoconstrição (KINI et al., 2002).

A hemostasia compreende dois mecanismos responsáveis pela formação e dissolução do coágulo de fibrina. Esse mecanismo oposto contribui para a manutenção do fluxo sanguíneo no interior dos vasos e mantém o equilíbrio no sangue (BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

Uma vasculatura normal possui muitos mecanismos para manter a coagulação em um estado quiescente. Um endotélio saudável expressa ecto-ADPase (CD39), produz prostaciclina (PGI₂) e óxido nítrico (NO). Esses componentes tendem a bloquear a adesão e a ativação plaquetária em um endotélio saudável (KEY, 2017).

Esse endotélio saudável possui propriedades anticoagulantes, antiplaquetárias ou fibrinolíticas. Após uma lesão, suas propriedades passam a ser pró-coagulantes (COTRAN *et*

al., 2000). Um vaso lesado envolve uma sequência de reações denominadas como cascata de coagulação que altera a fluidez do sangue para que possa se formar uma massa sólida de sangue chamada trombo (CARLOS; DE SOUSA FREITAS, 2007).

Coagulação é o processo que leva a formação da fibrina envolvendo interações controladas entre fatores de coagulação. Esse processo inclui a adesão e a ativação de plaquetas, juntamente com reações ordenadas dos fatores de coagulação (KEY, 2017). Nesse caso, as plaquetas se aderem formando um coágulo no local da lesão e os fatores de coagulação formam fios de fibrina fortalecendo o tampão. Assim, ocorre sucessivas divisões celulares restaurando o endotélio (BRAUD et al., 2000).

Para que ocorra uma hemostasia ideal, é necessária a atuação de três fatores interligados: integridade dos vasos, presença de plaquetas e mecanismo de coagulação do sangue para que ocorra a formação da fibrina resultando em um trombo (GARCIA-NAVARRO; PACHALY, 1994).

1.4- Compostos biologicamente ativos e suas aplicações

A trombose é considerada um desvio patológico da hemostasia sendo caracterizada pela formação de um trombo que oclui o vaso, podendo afetar artérias e veias (ENGELMANN, 2013). Esse tipo de coágulo pode se formar em artérias coronárias ou cerebrais e desencadeiam infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, respectivamente (GOLDHABER, 2012).

Portanto, a trombose é um importante problema de saúde que afeta muitas pessoas. Apesar de se ter abordagens antitrombóticas, que sejam efetivas para combater essa doença cardiovascular, a maioria delas aumenta o risco de hemorragia e, portanto, identificar novas estratégias é um importante passo para inibir a trombose arterial e venosa sem comprometer a

hemostasia normal (ENGELMANN, 2013). No desenvolvimento de agentes terapêuticos, as peçonhas fornecem muitas ferramentas úteis para decifrar vários processos fisiológicos para esse tipo de doença (KINI et al., 2002).

Além disso, várias toxinas de serpentes apresentam atividade analgésica em modelos experimentais de dor aguda e crônica e em humanos (ABDEL-DAIM, 2015), atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (SAMY, 2012; WEN, 2013), antiviral contra vários tipos de vírus, como o vírus da herpes (HUBBARD, 2012), febre amarela e dengue (MULLER, 2012), atividade antiparasitária contra *Leishmania* (PASSERO, 2007) e espécies de plasmódios (CASTILLO, 2012), atividade antifúngica (YAMANE, 2013) e anticancerígena (EL-REFAEL, 2009).

1.5- Classificação das enzimas presentes em peçonhas

As enzimas classificadas como fibrin(ogen)olíticas atuam sobre o sistema fibrinolítico que participa da remoção do coágulo sanguíneo. Essa característica de dissolução do coágulo pode ser aplicada em distúrbios na coagulação sanguínea como na trombose (SWENSON; MARKLAND, 2005).

As metaloproteases e serinoproteases são enzimas que se diferem pelo mecanismo de ação, mas desempenham a mesma função na natureza (SWENSON; MARKLAND, 2005). Essas duas enzimas são proteases que catalisam a clivagem das ligações peptídicas em proteínas. Um aspecto importante desse tipo de enzima é que algumas delas clivam ligações peptídicas adjacentes à resíduos de aminoácidos específicos (NELSON, 2013).

1.6- Serinoproteases

Encontrada em eucariotos, procariotos e nos seres humanos, as serinoproteases são responsáveis pela coordenação de funções fisiológicas como a digestão, resposta imune, coagulação sanguínea e reprodução (TYNDALL, 2005).

Segundo Perona e Craik (1995), as serinoproteases são proteases que apresentam uma tríade catalítica de aminoácidos conservada ($Ser^{195}, His^{57}, Asp^{102}$), principal critério para classificação dessa proteína. Essa enzima utiliza a serina como aminoácido nucleofílico no seu sítio ativo com a finalidade de quebrar as ligações peptídicas de proteínas (HEDSTROM, 2002).

Em peçonha de serpentes, essas enzimas atuam principalmente sobre proteínas plasmáticas que estão relacionadas à cascata da coagulação, sobre as plaquetas e sobre o sistema fibrinolítico (SERRANO, 2013; BOLDRINI-FRANÇA, 2015). Elas convertem o fibrinogênio em fibrina pela clivagem das cadeias A α e/ou B β (MATSUI, 2000).

As enzimas trombina-símile (do inglês: *thrombin-like enzyme* - TLE) são um grupo de enzimas serinoproteases que causam coagulação sanguínea *in vitro* e incoabilidade *in vivo*. A incoabilidade ocorre pela diminuição do fibrinogênio circulante, competindo com a trombina pela quebra do fibrinogênio (MAGALHÃES *et al.*, 2007). De acordo com Serrano (2013), esse tipo de enzima presente em peçonhas de serpentes representa um grupo muito estudado, pois afetam principalmente a homeostase nos vasos sanguíneos.

1.7- Bhalternina

A peçonha de *B. alternatus* apresenta elevada atividade proteolítica responsável pela maior parte dos efeitos sistêmicos observados quando há envenenamento (COSTA *et al.*, 2007). No artigo de Costa *et al.* (2010), foi descrita uma serinoprotease isolada a partir de

peçonha de serpente da espécie *B. alternatus*, a Bhalternina (Figura 1). A enzima foi purificada e sua sequência de aminoácidos foi determinada.

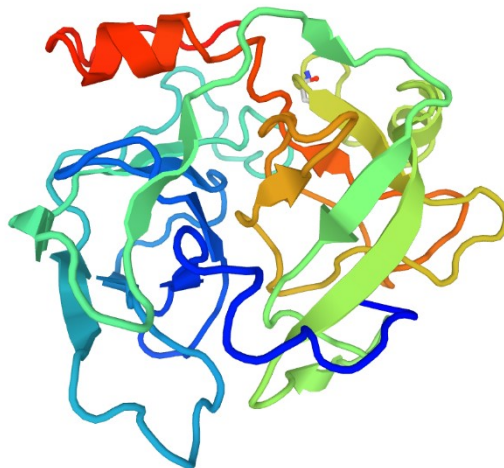


Figura 1. Modelo 3D teórico da Bhalternina (P0CG03) gerado pela técnica baseada em homologia. Formato *rainbow* de coloração da estrutura 3D, com início da cadeia polipeptídica em cores mais frias (azul) e no final da cadeia com cores mais quentes (vermelho) (SCHWEDE, 2003).

A administração dessa proteína *in vitro* resultou na coagulação do sangue e *in vivo* resultou na incoabilidade e então foi possível observar que essa proteína induz a desfibrinogenação *in vivo*. A partir destes resultados, assim como muitas enzimas presentes em outras peçonhas de espécies diferentes, esta foi considerada uma TLE (COSTA *et al.*, 2010).

A pesquisa de Costa *et al.* (2010) demonstrou que a Bhalternina hidrolisa a cadeia alfa do fibrinogênio, portanto, também foi classificada como uma alfa-fibrinogenase. Essas enzimas fibrinogenolíticas apresentam ser eficientes contra a coagulação, assim, podem ter atividades antitrombóticas.

1.8- Expressão heteróloga de proteínas

Ao longo dos anos, com o estudo do DNA, os geneticistas aprenderam a identificar, mover e colocar genes em outros organismos diferentes do de origem. Muitas dessas técnicas, são utilizadas para produzir proteínas recombinantes, nas quais, a maioria apresenta grande valor comercial. Portanto, inúmeros estudos se concentram em encontrar diferentes formas de produzi-las de forma eficiente (MACAULEY-PATRICK, 2005).

A levedura é adequada para a expressão de proteínas pela facilidade de manipulação genética, alta eficiência na transformação de DNA, elevada produção proteica a nível intra ou extracelular e capacidade de realizar modificações pós-traducionais em proteínas, como glicosilação e ligação dissulfeto (CREGG, 2000).

A *Pichia pastoris* pode ser cultivada em densidades celulares muito altas e a purificação é relativamente simples devido aos baixos níveis de proteínas nativas secretadas. Desse modo, o conjunto de importantes técnicas genéticas disponíveis com suas características positivas, a levedura é uma possível escolha para expressão proteica heteróloga (CREGG, 1993).

A tecnologia do DNA recombinante é uma metodologia na qual consiste em gerar fragmentos de DNA contendo genes de interesses. Nesse método, o fragmento é incorporado em um vetor adequado que é introduzido em um organismo hospedeiro. Esse organismo é adicionado em um meio de cultura para se multiplicar e produzir múltiplas cópias do fragmento de DNA que foi incorporado junto ao vetor (EMERY, 1981).

1.9- Justificativa

Segundo Kini (2006a), mesmo com um significativo progresso na compreensão das relações de estrutura, função e mecanismos de alguns anticoagulantes, ainda se encontram

muitas perguntas a serem respondidas à medida que outros anticoagulantes estão sendo descobertos.

Esses estudos contribuem no entendimento da formação de coágulos indesejados, que podem levar à debilitação com quadros de parada cardíaca e acidente vascular cerebral em pacientes que apresentam doenças cardio e cerebrovasculares, aterosclerose e hipertensão, podendo levar à morte (KINI, 2006b).

Atualmente, a caracterização das biomoléculas presentes na peçonha de serpentes tem se mostrado importante para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. O estudo desses compostos está cada vez mais atrativo para os pesquisadores pela complexa diversidade de interações que ocorrem entre as toxinas e os componentes que mantêm a estabilidade de um organismo.

A partir das características apresentadas, a obtenção da Bhalternina recombinante pode expandir as linhas de pesquisas realizadas com proteínas que apresentam ação anticoagulante, resultando no surgimento de novas alternativas terapêuticas eficazes no tratamento de disfunções trombóticas e de várias doenças, ampliando as perspectivas biotecnológicas.

Obter a Bhalternina isolada da peçonha da serpente é um processo complexo e a quantidade obtida é restrita. A obtenção dessa proteína por engenharia genética, contendo as mesmas propriedades da forma nativa, é importante para caracterização dessa enzima de maneira mais aprofundada e, possivelmente, no futuro, para o desenvolvimento de uma plataforma de produção de fármacos antitrombóticos devido às características apresentadas.

2- OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Realizar clonagem e obter o clone de levedura para a expressão da enzima Bhalternina da serpente *Bothrops alternatus* em sistema de levedura.

2.2 - Objetivos Específicos

- Construir o plasmídeo contendo a sequência codificante da Bhalternina.
- Realizar clonagem e obter um clone de bactérias contendo o plasmídeo construído.
- Obter clones da levedura *Pichia pastoris* contendo o DNA do plasmídeo construído.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Obtenção do fragmento que codifica a Bhalternina

A sequência nucleotídica que codifica a Bhalternina foi otimizada para a melhor expressão em levedura e posteriormente sintetizada pela empresa GenScript (Piscataway – NJ, EUA). O segmento otimizado (BH1) apresenta 451pb e se encontra ligado ao vetor pPIC9 entre os sítios *Eco* RI e *Not* I (Figura 2). Esse plasmídeo denominado pPICBH1 apresenta 8761pb e se encontra em bactérias TOP10 armazenado a -80°C.

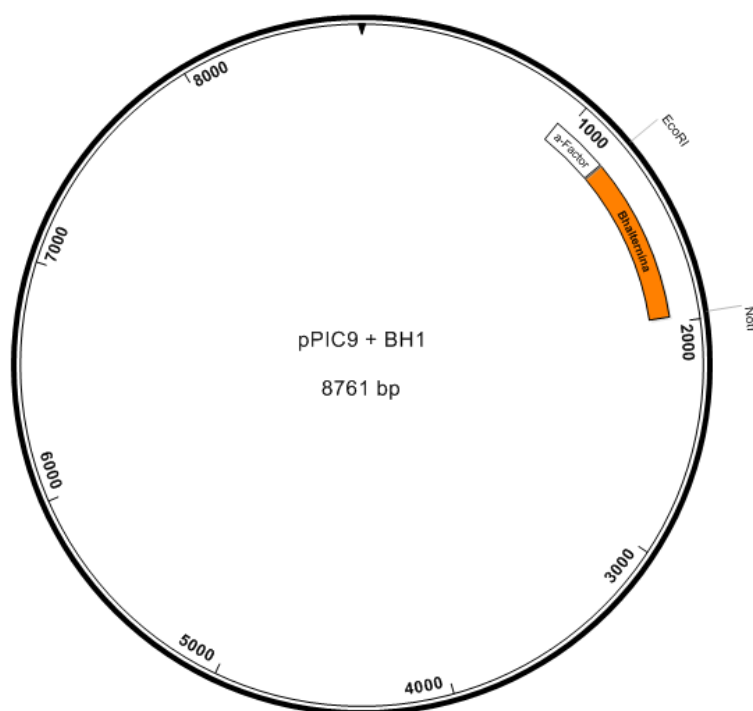


Figura 2. Esquema do DNA pPICBH1. Plasmídeo formado pelo vetor pPIC9 + BH1. Em laranja a Bhalternina e em branco o sinal de secreção α -Factor.

O DNA pPICBH1 foi obtido por meio de purificação com o Kit *QIAprep Spin Miniprep* da empresa QIAGEN (Hilden, Alemanha) por meio do protocolo QIAprep Miniprep Handbook (2015). Após a extração do plasmídeo das bactérias, foi realizado a digestão do pPICBH1 com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Not* I. O fragmento que codifica a Bhalternina foi separado por eletroforese e purificado pelo Kit *QIAquick Spin Purification* por meio do protocolo QIAquick Spin Handbook (2002).

Esse Kit purifica fragmentos que variam de 100pb a 10kb utilizando uma coluna com resina de sílica. Portanto, para separar os fragmentos de pPIC 9 e BH1, é necessário realizar eletroforese. Por esse método, é possível separar os dois fragmentos e cortar a parte do gel

que possui a banda referente ao BH1. Assim, é possível extrair o DNA desejado a partir do gel de agarose com a coluna presente no Kit.

3.2- Obtenção do vetor pPICZα A

O vetor pPICZα A (Figura 3), armazenado em bactérias TOP10 a -80°C, obtido pela empresa Thermo Fisher (Waltham – MA, EUA) também foi purificado pelo Kit *QIAprep Spin Miniprep*. Esse plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Not* I e purificado pelo Kit *QIAquick Spin Purification* por meio do protocolo QIAquick Spin Handbook (2002). Como o fragmento entre *Eco* RI e *Not* I possui 50pb (Figura 4), é possível purificar diretamente pela coluna presente no Kit, sem a necessidade de separação em gel de agarose, pois a resina presente na coluna deixa passar os fragmentos menores que 100pb.

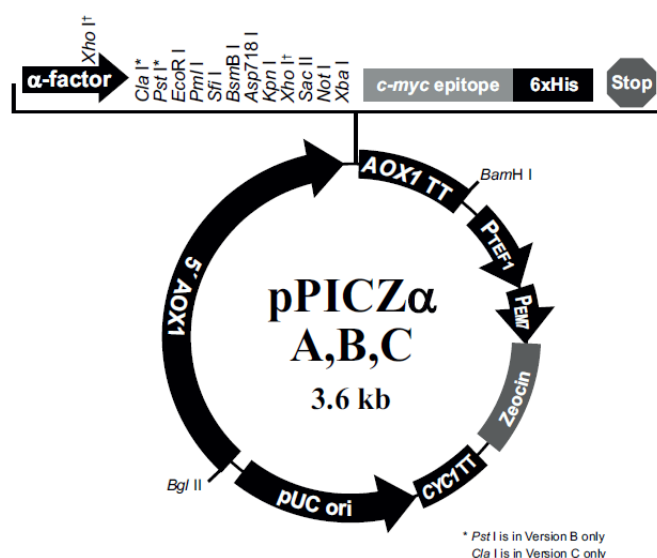


Figura 3. Esquema do vetor pPICZα. A figura resume as características dos vetores pPICZα A, B e C, apresentando a região de múltipla clonagem com os sítios de restrição que compõem o vetor. Fonte: adaptado de LIFE TECHNOLOGIES/ INVITROGEN (2010).

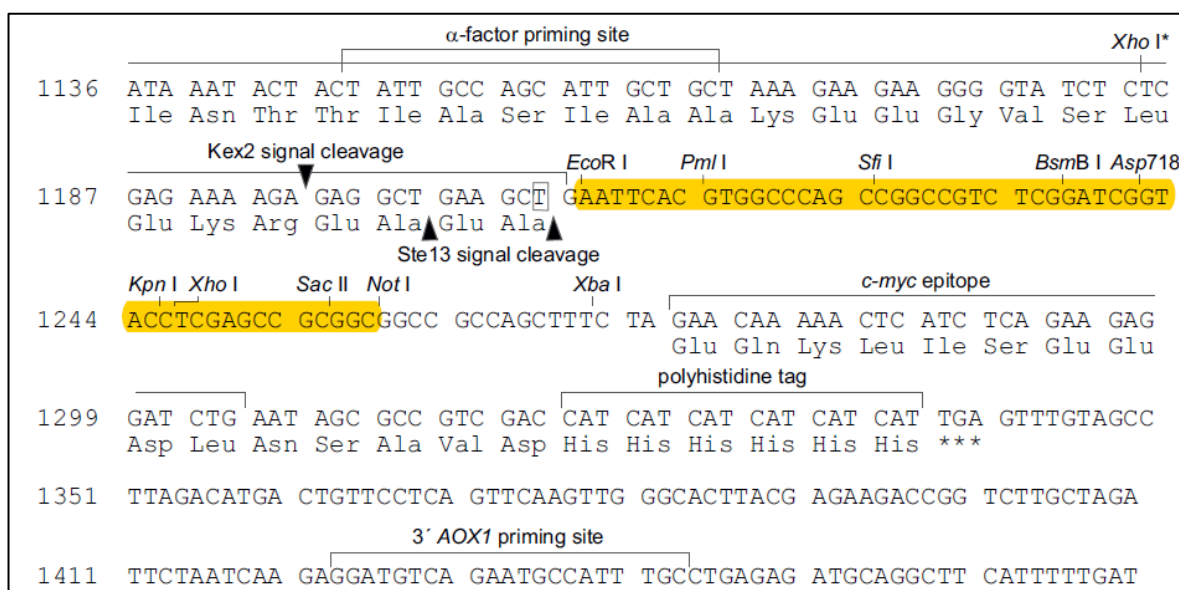


Figura 4. Parte da sequência do vetor pPICZα A. A sequência indicada em amarelo representa o fragmento que foi clivado entre os sítios de restrição *EcoRI* e *NotI* apresentando 50 pares de base entre os locais de corte das enzimas. Além disso, apresenta o sítio dos *primers* α-Factor e 3'AOX utilizados na metodologia. Fonte: adaptado de LIFE TECHNOLOGIES/ INVITROGEN (2010).

3.3- Construção do plasmídeo pPICZα A + BH1

Os DNAs pPICZα A digerido e BH1 foram submetidos a reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher/Fermentas, Waltham – MA, EUA) para formar o plasmídeo pPICZα A + BH1 (Figura 5). A reação de ligação foi realizada conforme o protocolo DNA Insert Ligation (sticky-end) into Vector DNA Thermo Fisher Scientific (2012).

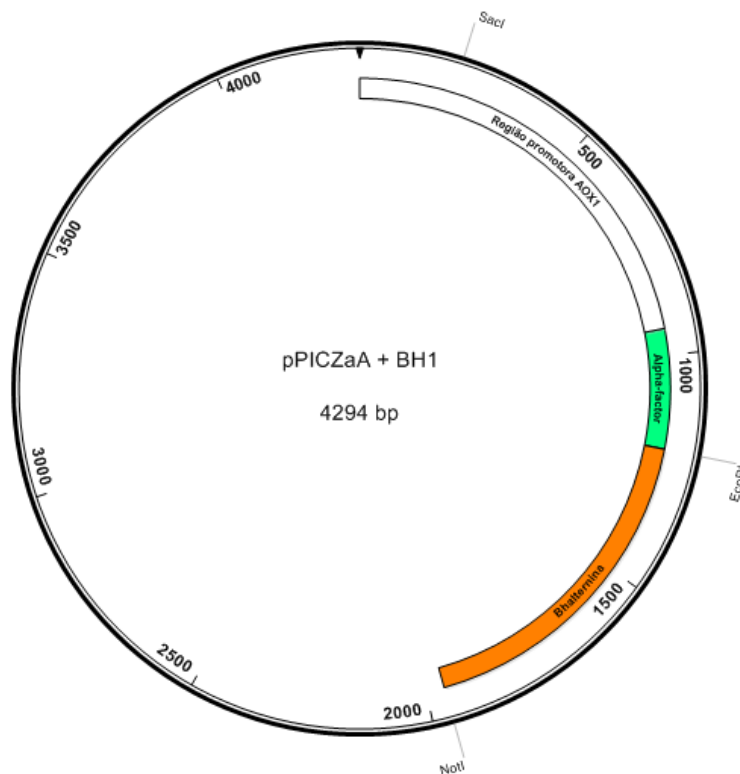


Figura 5. Esquema do plasmídeo pPICZα A + BH1. Em laranja a sequência que codifica a Bhalternina, em verde o sinal de secreção α-Factor e em branco a região do promotor AOX1.

3.4- Linearização do plasmídeo pPICZα A + BH1

O plasmídeo obtido pela reação de ligação foi digerido com a enzima *Sac* I que apresenta seu sítio de restrição presente somente no vetor para que esse DNA possa ser linearizado e incorporado no genoma da célula de levedura após a transformação. Com esse procedimento, a levedura consegue realizar a expressão da proteína de interesse.

3.5- Transformação de células competentes por eletroporação

A bactéria *E. coli*, cepa TOP10, e a levedura *Pichia pastoris*, cepa X-33, foram preparadas para a eletroporação seguindo a metodologia presente no manual EasySelect

Pichia Expression Kit (LIFE TECHNOLOGIES/INVITROGEN, 2010). Na transformação das células competentes foi utilizado o equipamento *MicroPulser electroporator* BioRad (Hercules – CA, EUA) com o programa Ec1 (pulso de 1,80kV) em cubeta 0,1cm, conforme especificado no manual do equipamento.

As bactérias competentes foram armazenadas a -80°C para posterior utilização na eletroporação. Para verificar a eficiência das bactérias competentes obtidas, as mesmas foram transformadas com o DNA pUC19 (Figura 6) e plaqueadas em meio LB com baixa concentração de NaCl (triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 0,5%), contendo ampicilina 100 µg/mL. De acordo com Sambrook e Russel (2001) as bactérias competentes devem apresentar eficiência de $2,5 \times 10^8$ transformantes/µg de pUC19.

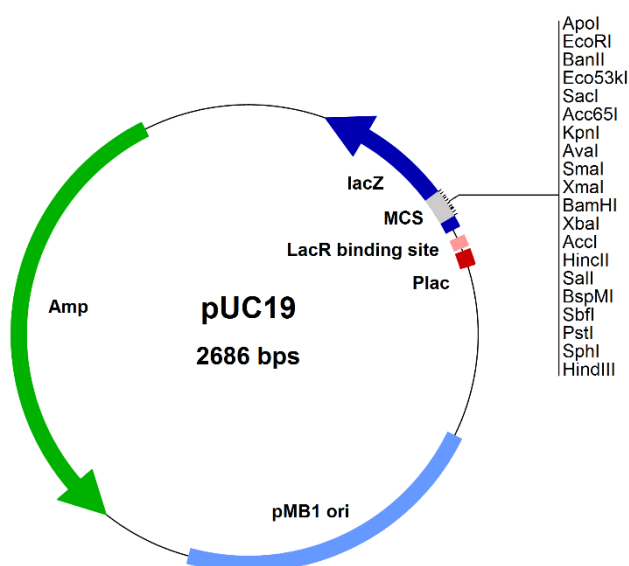


Figura 6. Esquema do DNA pUC 19. Esse DNA foi utilizado para testar a eficiência da bactéria eletrocompetente. Fonte: MoBiTec Molecular Biotechnology

As células de bactéria transformadas com a mistura da reação de ligação foram selecionadas em meio de cultura LB com baixa concentração de NaCl, contendo Zeocina (Thermo Fisher) 25 µg/mL.

As leveduras competentes foram mantidas no gelo até a utilização na eletroporação realizada no mesmo dia. As células de levedura transformadas com a mistura da reação de ligação foram selecionadas em meio de cultura YPDS (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%, sorbitol 1M), contendo Zeocina (Thermo Fisher) 100 µg/mL.

3.6- Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A mistura de reação (Tampão completo II KCl 1x Bioron, dNTPs 0,2mM Sigma, *primer forward* 0,3µM, *primer reverse* 0,3µM, 1U *Taq* DNA polimerase Invitrogen e H₂O para biologia molecular para volume final de 20µL) foi utilizada para realizar a PCR das colônias de bactéria. A mistura de reação com os *primers* 3'AOX e α -Factor foi distribuída em tubos de PCR. As colônias foram tocadas com a ponteira e agitadas no tubo de PCR com a mistura de reação. A amplificação foi feita a 94°C por 2min, 35 ciclos de 49°C por 30s, 52°C por 30s e 72°C por 1,5min e por último 72°C por 7min. Os *primers* 3'AOX e α -Factor amplificam um segmento de 1001pb no pPICZ α A + BH1 e 935pb no pPICBH1.

Para as colônias de levedura, as células das colônias foram cultivadas em meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%, sorbitol 1M), contendo Zeocina (Thermo Fisher) 100 µg/mL, centrifugadas, ressuspensas e rompidas com fenol, TE modificado (Tris-HCl 10mM pH 8,0, EDTA 0,1mM pH 8,0) e clorofórmio, agitadas e centrifugadas novamente. A parte aquosa (DNA) foi transferida para novos tubos e o DNA foi precipitado com 0,3M de acetato de sódio pH 5,6 e 0,7 volume de isopropanol.

Após centrifugação e descarte do sobrenadante, o sedimento foi lavado com etanol 70% e o DNA foi ressuspenso com TE modificado. Os DNAs extraídos das colônias foram submetidos à PCR com os *primers* elaborados α 2Factor e BH187RV que amplificam 411pb localizados no vetor pPICZ α A e no DNA de interesse BH1.

Cada produto de PCR foi analisado por eletroforeses com gel de agarose 0,4 ou 0,5%, com brometo de etídio ou RedView a 100V por 20-30min. A concentração do gel de agarose e o tempo foram determinados de acordo com o tamanho e a quantidade de fragmentos de DNA presentes na amostra que foi analisada. Os géis foram submetidos a luz ultravioleta para a visualização do DNA que neles continham e fotografados para documentação.

3.7- Sequenciamento do DNA pPICZ α A + BH1

O primeiro sequenciamento foi realizado com os *primers* 3'AOX e α -Factor presentes no manual EasySelect *Pichia* Expression Kit (LIFE TECHNOLOGIES/INVITROGEN, 2010). O segundo foi realizado com os *primers* α 82Factor e BH187RV que foram elaborados para confirmação da sequência do plasmídeo construído.

Os sequenciamentos foram realizados pelo Método de Sanger (SANGER, 1975) automatizado pelo equipamento utilizado *ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* através do serviço de sequenciamento ACTGene Análises Moleculares (LudwigBiotec - Alvorada, Brasil).

A sequência obtida pela leitura do eletroferograma resultante do sequenciamento foi alinhada pelo método de ClustalW do *software* Lasergene (DNASTAR, Madison – WI, EUA) com a sequência da construção virtual do plasmídeo pPICZ α A + BH1.

3.8- Purificação das colônias de levedura por estrias de esgotamento

As colônias selecionadas passaram por um processo de purificação por estrias de esgotamento em placas de meio de cultura. As colônias de levedura da placa resultante da transformação foram tocadas com a alça de platina estéril e, em uma placa de meio de cultura YPD com Zeocina (Thermo Fisher) 100 μ g/mL, a alça foi passada, riscando em zigue-zague,

no meio de cultura para que resultasse em colônias isoladas. As placas foram incubadas à 37°C por 9 dias e o processo se repetiu por mais uma vez resultando em duas etapas.

4- RESULTADOS

Após a purificação dos plasmídeos pPICBH1 e pPICZ α A, da bactéria que o continha, foi realizado uma eletroforese em gel de agarose (Figura 7) com uma alíquota da amostra para identificar a presença desse DNA na amostra. O gel de agarose indicou duas bandas nas duas amostras. Esse perfil ocorre pelas diferentes maneiras que os plasmídeos podem ser encontrados: super-enrolados ou relaxados. Assim, concluiu-se que os plasmídeos foram purificados corretamente. Além disso, apresentaram boa concentração identificada pela banda intensa.

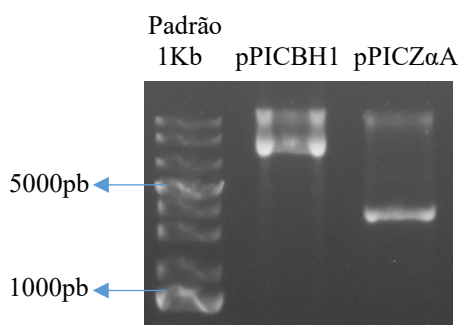


Figura 7. Gel de eletroforese dos plasmídeos pPICBH1 e pPICZ α A isolados. O gel de agarose foi realizado na concentração de 0,4%. Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas).

Posterior a digestão do DNA pPICBH1 foi realizado outra eletroforese em gel de agarose para a purificação do fragmento de BH1. A banda de BH1 indicada pela seta, foi cortada e purificada para a separação do fragmento de pPIC9 indicada pela seta (Figura 8).

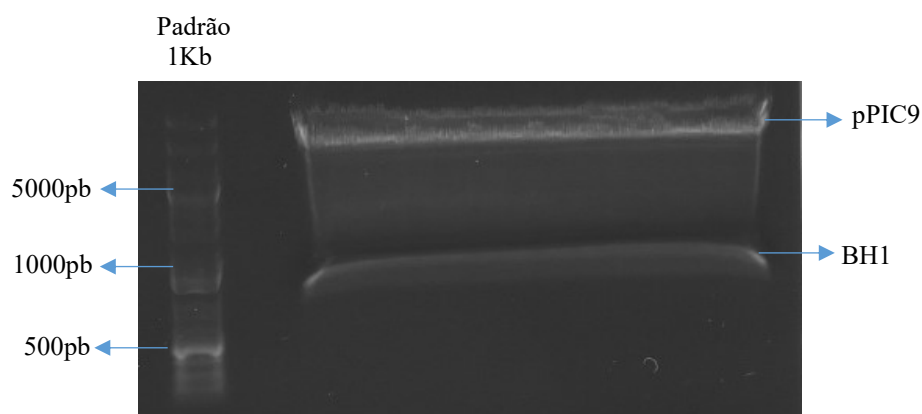


Figura 8. Gel de eletroforese dos fragmentos do pPICBH1 digerido. O gel de eletroforese foi realizado a 0,4% para melhor separação dos fragmentos a serem cortados do gel para sua purificação. Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas).

Para a confirmação da purificação dos fragmentos de BH1 e pPICZ α A foi realizada uma eletroforese (Figura 9), com uma alíquota das amostras afim de verificar o padrão de mobilidade dos fragmentos. O resultado dessa eletroforese apresentou uma banda em cada amostra indicando que o DNA foi purificado corretamente. Assim, obteve-se os dois fragmentos purificados para a utilização na ligação.

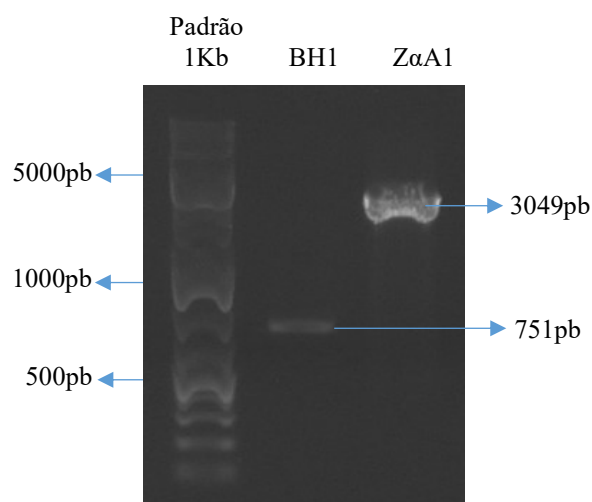


Figura 9. Gel de eletroforese para identificar os DNAs purificados. Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas).

Os dois fragmentos purificados foram ligados através de uma reação com a enzima ligase (Fermentas). Na figura 10, pode-se observar o gel de agarose com uma alíquota do produto da reação de ligação dos fragmentos pPICZ α A (controle) e pPICZ α A + BH1.

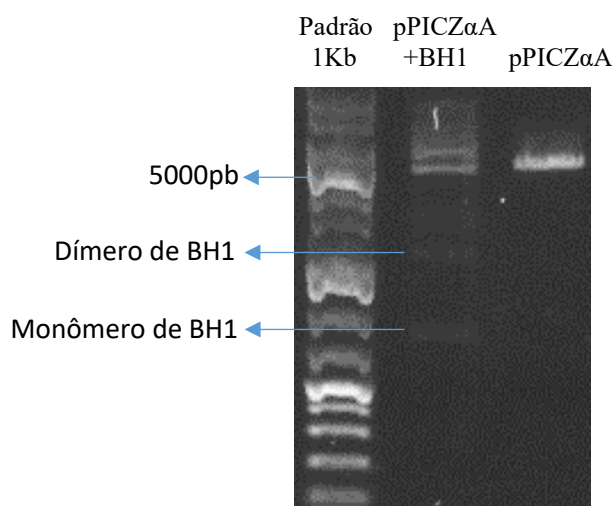


Figura 10. Eletroforese da ligação do vetor com o fragmento de interesse BH1. O gel de agarose foi realizado a 0,4%. Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas).

Na reação de ligação, há possibilidade de ocorrerem outras ligações além do DNA de interesse com o vetor, como a de duas moléculas do mesmo fragmento de DNA resultando em dímeros, por exemplo. Portanto, no gel de eletroforese realizado há mais de uma banda presente na amostra com o DNA de interesse.

Pode-se perceber na figura 6 que a amostra resultante da reação de ligação com os dois fragmentos apresentou mais de 4 bandas. Esse padrão de bandas indica monômeros e dímeros de BH1 indicados pelas setas, e acima de 5000pb, há um arraste e duas bandas mais definidas que podem indicar dímeros ou monômeros do vetor e também o DNA de interesse ligado ao vetor.

O preparo da bactéria competente foi realizado e a eficiência da suspensão obtida foi de $2,3 \times 10^7$ transformantes/ μ g de pUC19. Essas bactérias foram utilizadas para as duas

transformações, uma com o plasmídeo pPICZ α A + BH1 e outra com o pPICZ α A, que também passou pela reação de ligação, como controle.

Após as duas eletroporações e o plaqueamento das bactérias transformadas, as colônias foram numeradas de 1 a 13 (Figura 11), sendo que as colônias de 1 a 11 são bactérias transformadas com o produto da reação de ligação do pPICZ α A + BH1 (Figura 11.b) e as colônias 12 e 13 com o pPICZ α A, também resultante da reação de ligação, na placa controle (Figura 11.a).

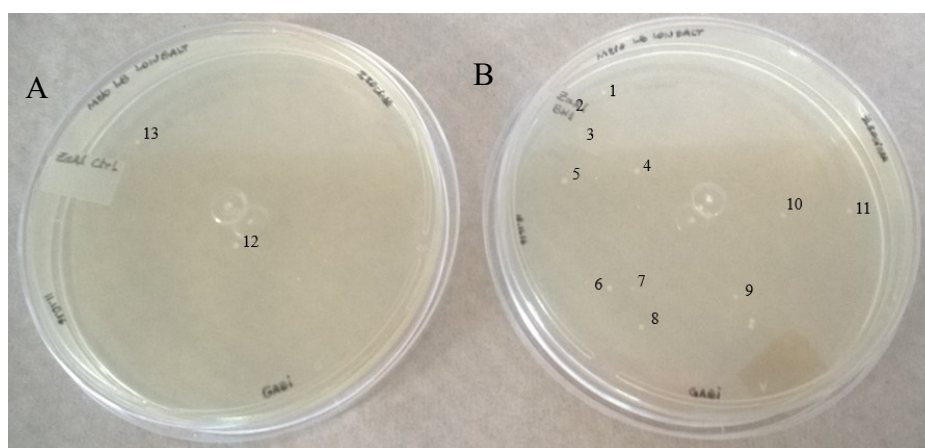


Figura 11. Colônias de bactérias transformadas cultivadas em placas de meio LB (baixa concentração de sal) com Zeocina (Thermo Fisher). Colônias de bactérias resistentes à Zeocina resultantes da transformação com o DNA da reação de ligação de BH1 com o vetor (B) e somente do vetor (A). As colônias submetidas a outros testes foram numeradas.

A PCR das 13 colônias foi executada com os *primers* α -Factor e 3'AOX1 e o resultado do gel de eletroforese segue na figura 12. As amostras das colônias 1 e 2 e de 6 a 9 apresentaram leves alterações no padrão de mobilidade comparado a banda do controle positivo pPICBH1. Já as outras amostras apresentaram mobilidade parecida com a banda presente no controle pPICZ α A. Como as bandas estão grossas e a diferença do tamanho dos segmentos amplificados no pPICZ α A + BH1 e pPICBH1 é pequena, não é possível afirmar

que o segmento amplificado nas amostras estão com o peso molecular maior que o controle positivo mas é provável que estejam representando o fragmento BH1 ligado ao de pPICZ α A.

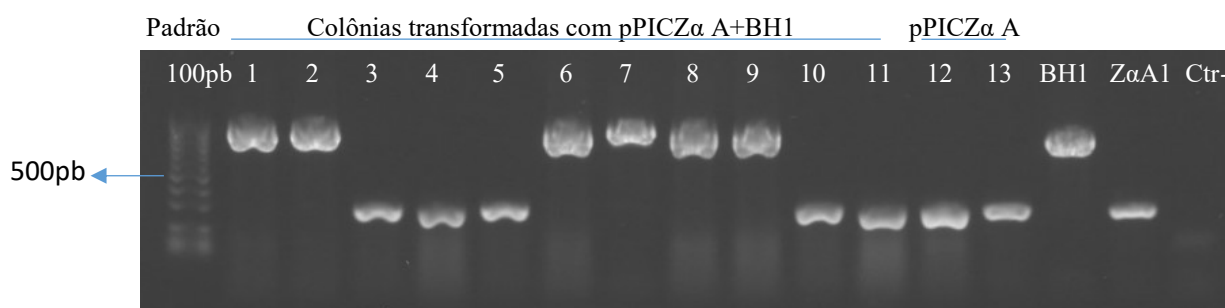


Figura 12. Eletroforese para confirmação do fragmento de interesse nas bactérias transformadas. Amostras da PCR realizada com as colônias resistentes a Zeocina resultantes da transformação da bactéria competente com o DNA da reação de ligação. Padrão de peso molecular 100pb LowRanger DNA Ladder NORGEN (Thorold, Canadá). Gel de agarose 0,5%.

As colônias 7 e 9 foram escolhidas aleatoriamente e o DNA das mesmas foram digeridos com as enzimas *Eco* RI e *Not* I para confirmar se os dois fragmentos ligados foram incorporados pelas bactérias. O resultado da eletroforese na figura 13 mostra que, diferente da reação do controle sem as enzimas, as duas amostras digeridas apresentaram duas bandas, que são referentes ao fragmento de pPICZ α A e ao BH1. O controle apresentou apenas uma banda indicando que não houve digestão.

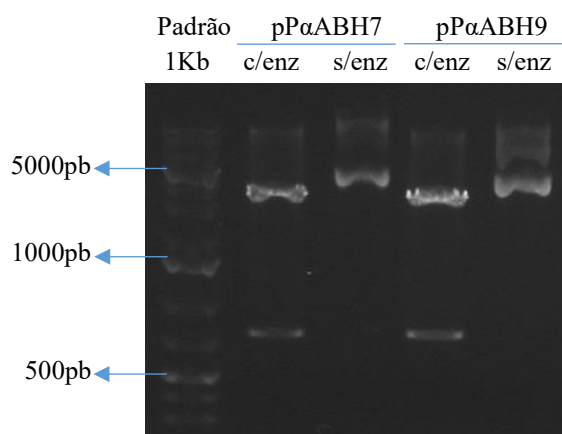


Figura 13. Eletroforese posterior à digestão. Os plasmídeos das colônias 7 (pPaABH7) e 9 (pPaABH9) digeridos com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Not* I (c/enz) e como controle, uma alíquota do DNA sem digestão (s/enz). Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas). Gel de agarose 0,4%.

Como o padrão de mobilidade dos DNAs das duas colônias foi o mesmo, foi escolhido apenas um DNA para o sequenciamento. Para confirmar se o plasmídeo construído possuía a sequência correta de BH1, o DNA do plasmídeo da colônia 9 (pPaABH9) foi sequenciado com os primers 3'AOX e α -Factor (Figura 14)

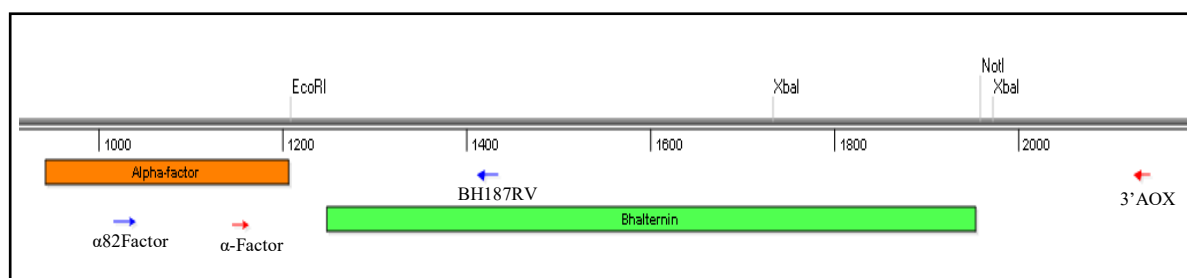


Figura 14. Primers utilizados nos sequenciamentos. Os primers 3'AOX e α -Factor foram utilizados no primeiro sequenciamento e o α 82Factor e BH187RV utilizados no segundo.

O primeiro sequenciamento obtido apresentou picos bem definidos na porção mediana do eletroferograma (Figura 15). O alinhamento entre as sequências obtida e esperada foi realizado e pôde-se observar que no início do sequenciamento resultou na falta de três nucleotídeos do DNA sequenciado.

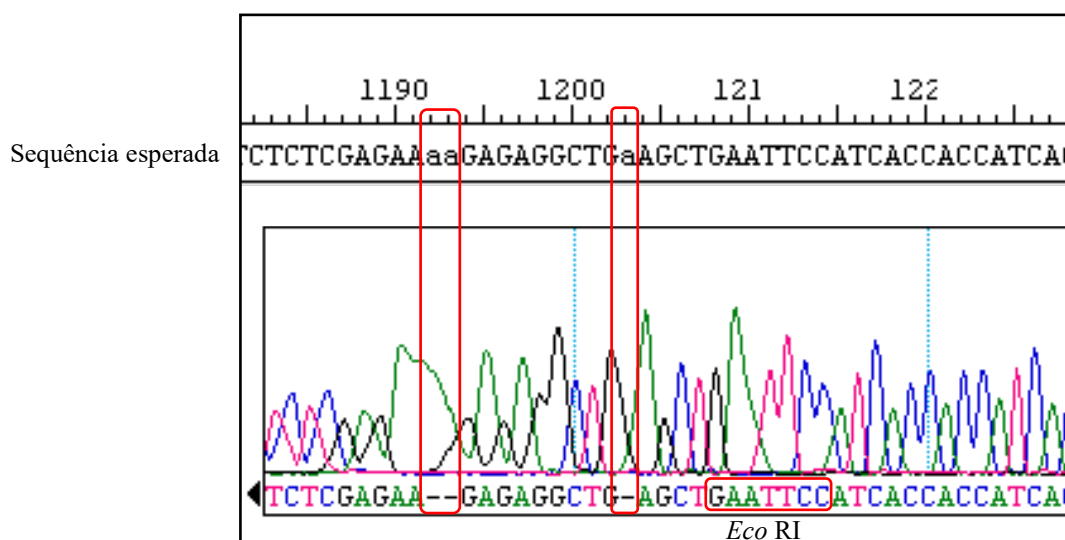


Figura 15. Eletroferograma do primeiro sequenciamento das colônias de bactérias transformadas. Os picos da imagem estão localizados próximo ao *primer forward* no sequenciamento. As marcações indicam as possíveis deleções no sequenciamento antes do sítio *Eco RI* também marcado em vermelho.

O resultado do sequenciamento mostrou dois possíveis eventos de deleção, um deles nas posições 1192, 1193 e outro no nucleotídeo 1203, conforme mostra a Figura 15. Esses eventos estariam localizados antes do sítio de restrição de *Eco RI*, sendo que depois desse sítio, incluindo a sequência que codifica a Bhalternina, se manteve idêntica à esperada. Observou-se que as posições das possíveis deleções estavam localizadas no início do sequenciamento, próximo ao *primer forward*.

Como essa região do sequenciamento está muito próxima ao primer havia uma possibilidade de que esta parte do sequenciamento não estivesse de acordo com a sequência real do plasmídeo construído, pois o início e o final do sequenciamento, locais próximo e distante aos *primers*, respectivamente, podem apresentar baixa qualidade durante o processo de sequenciamento, resultando na leitura errônea de bases pelos picos mal definidos do eletroferograma.

A sequência que codifica a Bhalternina se manteve, e no sequenciamento houve a deleção de três nucleotídeos que não fazem parte da sequência da proteína de interesse. O

primeiro evento de deleção modifica a fase de leitura e o segundo volta para a fase de leitura correta. Portanto, mesmo com as deleções, esse DNA poderia ser utilizado para a expressão correta da proteína.

Assim, foi realizado o alinhamento da sequência de nucleotídeos e a deduzida de aminoácidos (Figura 16, A e B, respectivamente). Ao realizar o alinhamento dos aminoácidos foi observado que essa mudança resultou em um códon de parada, inviabilizando o uso desse plasmídeo para a produção da proteína madura ativa, sendo que no processo de tradução, o evento seria interrompido.

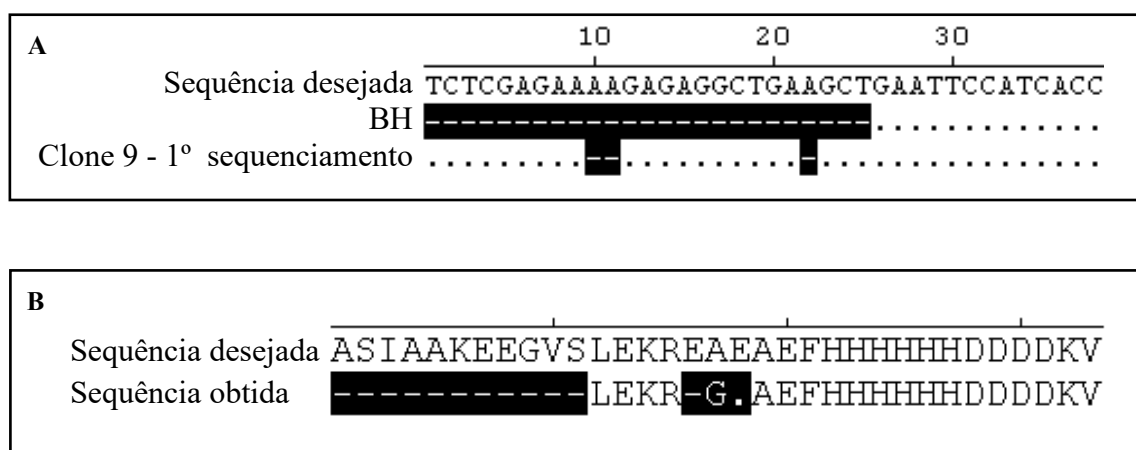


Figura 16. Alinhamentos das sequências do primeiro sequenciamento. O alinhamento foi realizado entre as sequências desejadas e a sequência nucleotídica obtida pelo sequenciamento (A) e a sequência deduzida de aminoácidos (B) de pPaABH9. Pontos em A representam nucleotídeos idênticos, enquanto que traços representam sua ausência. O ponto em B representa *stop codon*.

Com base nesse resultado, um par de *primer* foi sintetizado, sendo eles α 2Factor e BH187RV, para que os eventos de deleção se localizassem na porção mediana do sequenciamento com o objetivo de melhorar a qualidade e verificar se realmente ocorreram deleções neste local. A sequência obtida pelo sequenciamento foi alinhada com a virtual e também com a do primeiro sequenciamento, como mostrado na figura 17.

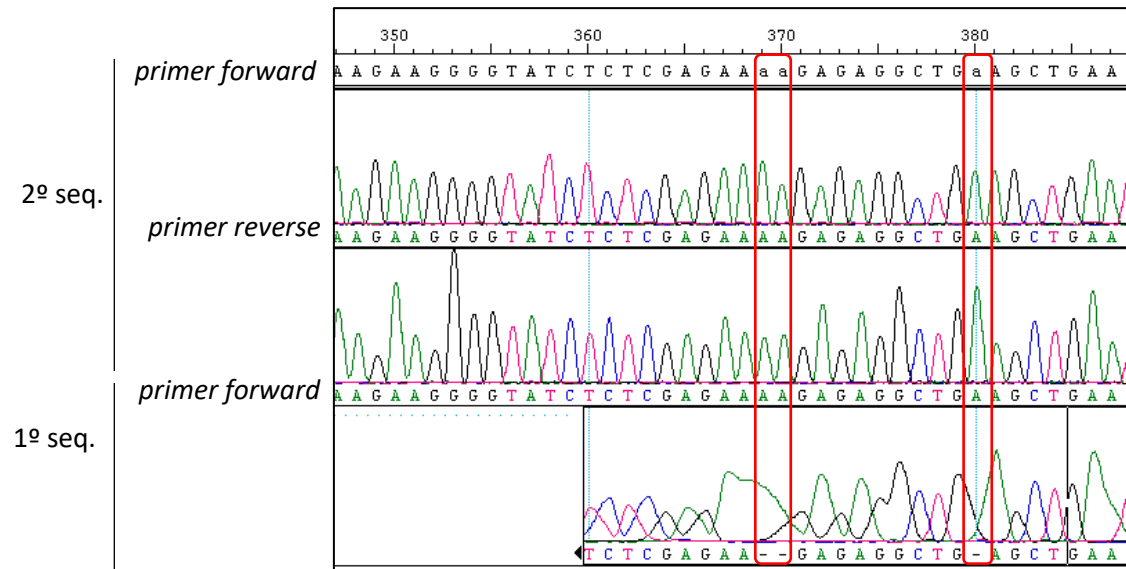


Figura 17. Parte do eletroferograma do sequenciamento. Observam-se os picos do segundo sequenciamento no mesmo local onde as possíveis deleções no primeiro sequenciamento haviam sido observadas. As marcações em vermelho indicam o local das possíveis deleções no primeiro e segundo sequenciamento.

Na figura 17, pode-se perceber que ao realizar o alinhamento do segundo sequenciamento, houve a confirmação de que não houve deleção em nenhuma parte da sequência no plasmídeo construído.

Após a confirmação da sequência obtida pela ligação do vetor ao DNA de interesse, foi realizada a reação de linearização dos plasmídeos com a enzima *Sac* I. Além da digestão com *Sac* I, uma alíquota de cada DNA foi digerida com *Eco* RI juntamente com *Sac* I, para verificar se a enzima *Sac* I estava ativa. Como controle, outra alíquota foi adicionada sem enzima. Os DNAs digeridos com as duas enzimas apresentaram duas bandas indicando os dois cortes pelas duas enzimas de restrição, portanto, pôde-se concluir que as enzimas estavam ativas, indicando que o DNA foi linearizado corretamente na digestão com *Sac* I (Figura 18).

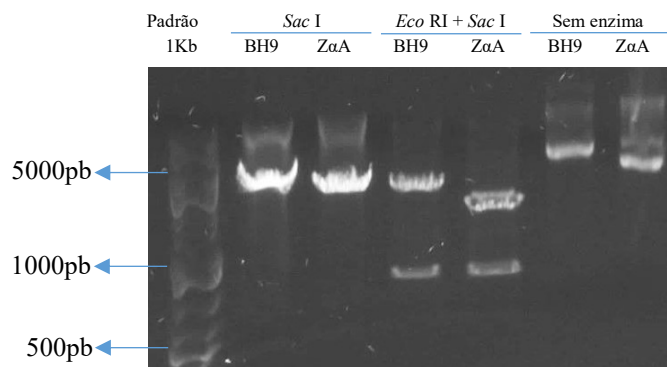


Figura 18. Gel de eletroforese das amostras pPaABH9 e pPICZa A. As amostras foram digeridas com *Sac I*, *Eco RI* e *Sac I* ou não digeridas, como controle. Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas). Gel de agarose 0,4%.

As amostras com os DNAs linearizados foram utilizadas na transformação das leveduras eletrocompetentes que foram preparadas para a eletroporação. As suspensões obtidas pela eletroporação foram plaqueadas em meio YPDS contendo Zeocina (Thermo Fisher) e incubadas à 30°C por 9 dias para que as colônias apresentassem o tamanho desejado (Figura 19).

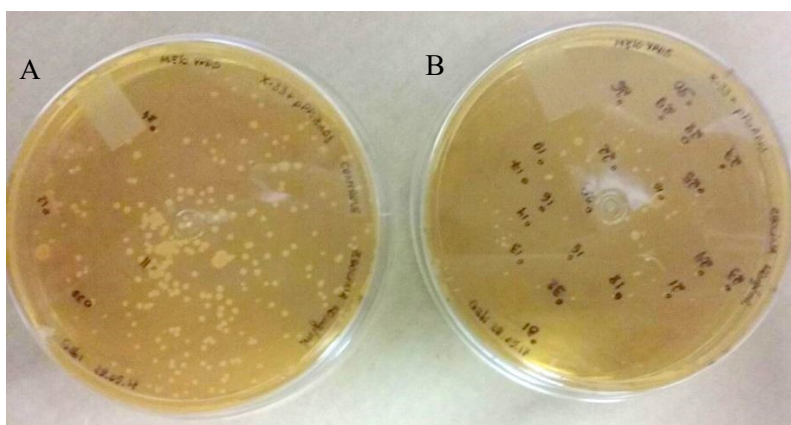


Figura 19. Colônias de leveduras transformadas cultivadas em placas de meio YPDS com Zeocina (Thermo Fisher). Colônias de leveduras resistentes a Zeocina resultantes da transformação com o DNA linearizado de BH1 com o vetor (B) e somente com o vetor (A). As colônias marcadas foram testadas por PCR para a confirmação do DNA de interesse nas células.

Da placa resultante da transformação de levedura (Figura 19), foram escolhidas oito colônias isoladas e numeradas de 13 a 20 da placa B e duas colônias da placa A numeradas 35 e 36 resultando em 10 colônias no total. Essas colônias passaram por duas etapas de purificação por estrias de esgotamento.

As 10 colônias da placa resultante da transformação e apenas uma colônia isolada da segunda etapa de purificação foram utilizadas para a extração e concentração do DNA. O DNA foi utilizado na PCR com os *primers* α 82Factor e BH187RV (Figura 14) para a confirmação da presença do gene de interesse (Figura 20).

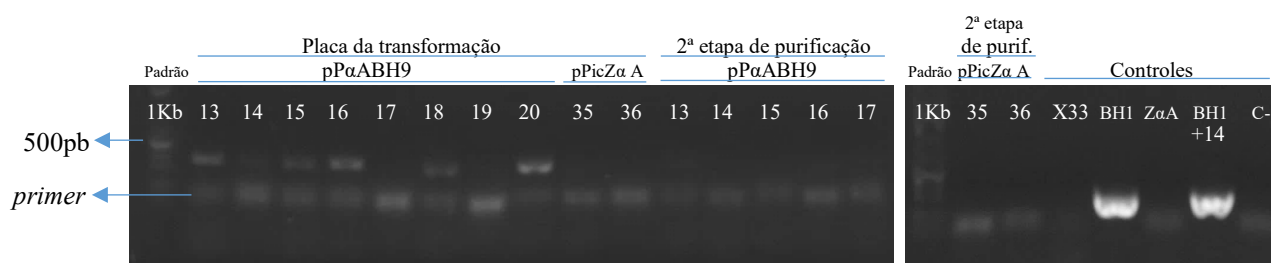


Figura 20. Gel de eletroforese do DNA extraído das colônias de levedura transformadas. Apresentam as amostras das colônias da placa de transformação e da segunda placa de purificação. X33: DNA das células de levedura X-33; C-: Controle negativo. Padrão de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas). Gel de agarose 0,5%.

No gel de eletroforese com as amostras da PCR, foi possível observar a presença do segmento de DNA amplificado na maioria dos DNAs das colônias da placa da transformação, cultivadas na presença de Zeocina (Thermo Fisher), que pôde ser confirmado pelo tamanho de 411pb. Na segunda etapa de purificação para obtenção dos clones não foi possível detectar o DNA amplificado.

As bandas que resultaram em menor peso molecular são os primers utilizados na PCR que também são detectados com a utilização de RedView.

Nas colônias 35 e 36 da placa resultante da transformação, o DNA não foi detectado pois o primer BH187RV é complementar apenas a sequência que codifica a Bhalternina. Provavelmente esse DNA não está presente nessas colônias, pois elas resultam da transformação com o produto da reação de linearização do pPICZα A.

Como as etapas de purificação foram realizadas na presença de Zeocina (Thermo Fisher), é provável que as colônias contenham o plasmídeo, mas o segmento não esteja sendo detectado por PCR. Portanto será necessário o aprimoramento da PCR.

5- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Ao realizar o sequenciamento do pPαABH9 como novos primers, verificou-se que a sequência nucleotídica obtida apresentava a sequência desejada para a expressão da Bhalternina. Depois da transformação das leveduras com esse plasmídeo, foi possível detectar a sequência nas colônias que cresceram na placa da transformação. Neste trabalho, foi realizada a clonagem e a obtenção das colônias de levedura com o DNA da Bhalternina para que, futuramente, sejam realizados experimentos para a expressão da proteína, que será alvo de estudos de atividade enzimática.

A expressão de proteínas de serpentes apresenta dificuldades por serem ricas em pontes dissulfeto. O sistema de *P. pastoris* é amplamente utilizado e oferece muitas vantagens comparado a outros sistemas (WHITE; KEMPI; KOMIVES, 1994). Atualmente, estão disponíveis muitas cepas de *P. pastoris* que apresentam muitos genótipos diferenciados e vetores com diferentes promotores e sinais de secreção (CREGG et al., 2000).

A enzima Batroxobina, por exemplo, é uma TLE obtida da peçonha da *B. atrox moojeni*. No trabalho de You et al (2004), o gene que codifica essa proteína foi clonado e expresso em uma cepa GS115 de *P. pastoris*. Foram realizadas análises funcionais que apresentaram atividades bioquímicas semelhantes a Batroxobina ativa. A proteína

recombinante converteu o fibrinogênio em um coágulo de fibrina *in vitro* e reduziu o tempo de sangramento e de coagulação total do sangue *in vivo*. Portanto, as evidências sugeriram que essa enzima recombinante pode ser utilizada como um potente agente procoagulante.

Também no trabalho de Yang et al (2002), a Gussurobina, uma TLE que possui glicosilação, da serpente *Gloydius ussuriensis*, foi obtida, clonada e expressa na cepa GS115 de *P. pastoris*. Essa proteína foi purificada em cromatografia e obteve rendimento de 3,5mg/L.

A obtenção do clone de levedura com o gene da Bhalternina apresenta um importante passo, visando a produção da enzima para sua avaliação no tratamento de muitas doenças. Neste sentido, o clone de levedura com a presença do DNA da Bhalternina permitirá a expressão da mesma em laboratório, garantindo uma forma mais rápida e eficiente de produção para que a proteína seja melhor estudada.

6- REFERÊNCIAS

ABDEL-DAIM, M. M. et al. Analgesic, Antipyretic and Anti-inflammatory Activities of the Egyptian Spitting Cobra; *Naja nubiae* Venom. **Journal of Forensic Toxicology & Pharmacology**, v. 4, p. 261-265, 2015.

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. 9971-9986, 2015.

BRASIL. Fundação Nacional da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília – DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília – DF, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília – DF, 2014.

BRAUD, S. et al. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, n. 9, p. 851-859, 2000.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostiasis. **Biochimie**, v. 82, p. 851-859, 2000.

CALVETE, J. J. Antivenomics and venom phenotyping: a marriage of convenience to address the performance and range of clinical use of antivenoms. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1284-1291, 2010.

CARLOS, M. M. L.; DE SOUSA FREITAS, P. D. F. Estudo da cascata de coagulação sangüínea e seus valores de referência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 1, n. 2, p. 49-55, 2007.

CASTILLO, J. C. Q. et al. In vitro antiplasmodial activity of phospholipases A2 and a phospholipase homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxins**, v. 4, n. 12, p. 1500-1516, 2012.

COSTA, J. O. et al. Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from *Bothrops alternatus* venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. 640-654, 2007.

COSTA, J. O. et al. Bhalternin: functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. **Toxicon**, v. 55, n. 7, p. 1365-1377, 2010.

COTRAN, R. S. et al. Distúrbios hemodinâmicos, trombose e choque. **Cotran RS, Kumar V. & Collins T. Robbins: Patologia Estrutural e Funcional**, v. 6, 2000.

CREGG, J. M. et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23-52, 2000.

CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Nature Biotechnology**, v. 11, n. 8, p. 905-910, 1993.

EL-REFAEL, M. F.; SARKAR, N. H. Snake venom inhibits the growth of mouse mammary tumor cells in vitro and in vivo. **Toxicon**, v. 54, n. 1, p. 33-41, 2009.

EMERY, A. E. H. Recombinant DNA technology. **The Lancet**, v. 318, n. 8260-8261, p. 1406-1409, 1981.

ENGELMANN, B.; MASSBERG, S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 1, p. 34-45, 2013.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K.; PACHALY, J. R. **Manual de hematologia veterinária**. Varela, 1994.

GOLDHABER, S. Z.; BOUNAMEAUX, H. Pulmonary embolism and deep vein thrombosis. **The Lancet**, v. 379, n. 9828, p. 1835-1846, 2012.

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

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical reviews**, v. 102 n. 12, p. 4501-4524, 2002.

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

JIMÉNEZ-PORRAS, J. M. Biochemistry of snake venoms. **Clinical Toxicology**, v. 3, p. 389-431, 1970.

KEY, N. S.; MAKRIS, M.; LILLICRAP, D. **Practical hemostasis and thrombosis**. John Wiley & Sons, 2017.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochemical Journal**, v. 397, n. 3, p. 377-387, 2006a.

KINI, R. M. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. **Pathophysiology of haemostasis and thrombosis**, v. 34, n. 4-5, p. 200-204, 2006b.

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

LIFE TECHNOLOGIES/INVITROGEN. **EasySelect Pichia Expression Kit**: For Expression of Recombinant Proteins Using Ppicz and pPICZ α in *Pichia pastoris*. Cat. No. K1740-01, 2010.

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

MACHADO, C. Um panorama dos acidentes por animais peçonhentos no Brasil. **Journal Health NPEPS**, v. 1, n. 1, 2016.

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

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting homostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1, p. 146-156, 2000.

MULLER, V. D. M. et al. Crotoxin and phospholipases A 2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 507-515, 2012.

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

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

PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Protein Science**, v. 4, n. 3, p. 337-360, 1995.

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

QIAGEN. **QIAquick Spin Handbook**. 34 p., 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

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

SANGER, F., COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of molecular biology**, v. 94, n. 3, p. 441-446, 1975.

SCHWEDE, T. et al. SWISS-MODEL: an automated protein homologymodeling server. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 3381-3385, 2003.

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

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

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

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

WEN, Y. L. et al. Antibacterial and membrane damaging activities of β -bungarotoxin B chain. **Journal of Peptide Science**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2013.

WHITE, C. E.; KEMPI, N. M.; KOMIVES, E. A. Expression of highly disulfide-bonded proteins in *Pichia pastoris*. **Structure**, v. 2, p. 1003-1005, 1994.

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

YANG, Q. et al. Cloning, expression and purification of gussurobin, a thrombin-like enzyme from the snake venom of Gloydius ussuriensis. **Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 34, p. 6-10, 2002.

YOU, W. K. et al. Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from Pichia pastoris. **FEBS letters**, v. 571, p. 67-73, 2004.