

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

Expressão transiente de uma Serinoprotease *thrombin-like* (rBPSP-I) da peçonha de
Bothrops pauloensis em *Nicotiana benthamiana*

José Augusto Leoncio Gomide

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

Uberlândia - MG

Dezembro - 2019

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

Expressão transiente de uma Serinoprotease *thrombin-like* (rBPSP-I) da peçonha de
Bothrops pauloensis em *Nicotiana benthamiana*

José Augusto Leoncio Gomide

Prof. Dr. Rafael Nascimento

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

Uberlândia - MG

Dezembro - 2019

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

Expressão transiente de uma Serinoprotease *thrombin-like* (rBPSP-I) da peçonha de
Bothrops pauloensis em *Nicotiana benthamiana*

José Augusto Leoncio Gomide

Prof. Dr. Rafael Nascimento

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

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG

Dezembro – 2019

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

Expressão transiente de uma Serinoprotease *thrombin-like* (rBPSP-I) da peçonha de
Bothrops pauloensis em *Nicotiana benthamiana*

José Augusto Leoncio Gomide

Aprovado pela Banca Examinadora em: 16/12/2019 Nota: 100

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. A. Leoncio Gomide', is written over a white rectangular area. This area is partially obscured by a large black rectangular redaction box on the right side. A horizontal line passes through the signature.

Uberlândia, 19 de dezembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a minha família, a qual tem sido meu maior suporte, minha maior e principal fonte de amor e carinho. Dedico esse Trabalho de Conclusão de Curso ao meu pai, que nunca desistiu de mim e se dedicou intensamente para a minha criação, sendo essencial para o meu amadurecimento e desenvolvimento pessoal e profissional, assim como para minha mãe, a pessoa mais carinhosa e amorosa que conheço, que me ensinou a ser autêntico e íntegro, além de enxergar beleza na humildade.

Além disso, agradeço ao Professor Dr. Rafael Nascimento, o qual me aceitou no seu grupo de pesquisa, confiando no meu potencial e possibilitou a realização de todo esse trabalho pelo qual tive muita paixão ao realiza-lo.

Agradeço a Professora Dra. Renata Santos Rodrigues por todo seu apoio na realização dos testes de atividade da serino protease, além pelo sua paciência, carisma e dedicação por este projeto. Além disso, quero agradecer-la por ter realizado os estudos anteriores, os quais possibilitaram a realização deste trabalho além da sua grande contribuição a ciência brasileira.

Também gostaria de agradecer imensamente a Dra. Hebréia que me ensinou como realizar todos os experimentos deste trabalho, me fazendo imergir sobre todo o processo de modo a confiar em minha responsabilidade e potencial, mas, mais importante, ela me ensinou lições valiosas que ficarão comigo como profissional.

À Ma. Jessica Souza Brito, meus agradecimentos por me ensinar a riqueza dos detalhes, por sempre me corrigir quando necessário, por me sempre me auxiliar quando pedido! A Jéssica é um exemplo o qual quero muito seguir profissionalmente!

À minha amiga Letícia Lonardoni, meu muito obrigado pela companhia, pelo apoio o qual você sempre depositou sobre mim e especialmente pela amizade! Sem você, eu não conseguiria ter ultrapassado os obstáculos para terminar este trabalho!

Também agradeço a todos meus amigos e amigas que me apoiaram nos momentos difíceis duante a minha graduação, tanto os que conheci durante a faculdade, como os que me acompanham desde muito antes.

Agradeço ao Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia assim como o Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, Pesquisador Responsável pelo Laboratório, por possibilitar a realização deste trabalho, assim como todos os seus integrantes, que me ajudaram

em pequenas tarefas diárias, mas que significaram muito para mim e para conclusão de deste estudo.

RESUMO

A peçonha ofídica é composta majoritariamente de proteínas, como as serinoproteases. Entre essas, especifica-se as serinoproteases *thrombin-like*, cujo efeito coagulante já foi comprovado, sendo assim, um possível fármaco para o tratamento de desregulações hemostáticas, como a Hemofilia. Desse modo, visou-se realizar a síntese e a caracterização funcional da serinoprotease *thrombin-like* recombinante (rSBP-I) da peçonha de *Bothrops pauloensis*, serpente típica do Cerrado brasileiro, expressa em *Nicotiana benthamiana*. Para a realização da síntese da proteína de interesse fez-se a clonagem de colônias de *E. coli* DH5 α , previamente transformadas com a sequência de genes referente a rSBP-I inserida no vetor pEAQ-HT, e posterior transformação por eletroporação de colônias de *R. radiobacter* EHA105 com o material genético de colônias de *E. coli* com transformação confirmada por PCR seguida de uma eletroforese em gel de agarose. Depois de confirmar a transformação das *R. radiobacter*, realizou-se a agroinfiltração com colônias bacterianas confirmadas na região abaxial de folhas de *Nicotiana benthamiana* por pressão de seringa. Cinco dias após a infiltração, realizou-se a coleta das folhas infiltradas e material selvagem (folhas de plantas não infiltradas). Posteriormente, fez-se a extração proteica dos materiais coletados, cujos extratos foram purificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Tais materiais purificados foram dialisados, liofilizados e ressuspensos, sendo posteriormente quantificados pelo método de Bradford, assim como os extratos proteicos. Para confirmar a expressão da rSBP-I, realizou-se o protocolo de Western Blotting tanto dos extratos quanto dos materiais purificados. De modo a determinar a funcionalidade parcial da rSBP-I expressa, analisou-se a Atividade Fibrinogenolítica da proteína com variação de tempo de reação. Ao final do estudo, foi detectada uma proteína presente no material extraído das folhas infiltradas com a construção rBPSP-I e ausente no material controle. Entretanto a massa molecular observada é inferior a massa teórica esperada, fazendo com que não fosse possível afirmar que proteína recombinante de interesse foi produzida em plantas de *Nicotiana benthamiana* infiltradas. Foi possível observar um efeito fibrinogenolítico em extratos proteicos de folhas infiltradas no tratamento de 60 minutos quando comparado ao material controle. Estudos posteriores deverão ser realizados para a confirmação da identidade da proteína expressa.

Palavras-Chave: Distúrbios Hemostáticos, Hemofilia, Biofármaco, Biotecnologia Vegetal, Proteína Recombinante.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 JUSTIFICATIVA	8
3 OBJETIVOS	9
3.1 OPBJETIVOS GERAIS.....	9
3.2 OPBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
4 METODOLOGIA.....	10
4.1 CONSTRUCTO GÊNICO DA SEQUÊNCIA DE INTERESSE	10
4.2 CLONAGEM DE BACTÉRIAS <i>E. coli</i> DH5A ELETROPORADAS COM GENE DE INTERESSE INSERIDO NO VETOR PEAQ-HT	11
4.2.1 Confirmação da transformação das bactérias <i>E. coli</i> eletroporadas	11
4.3 TRANSFORMAÇÃO DE <i>R. radiobacter</i>	11
4.3.1 Produção de células eletrocompetentes de <i>R. radiobacter</i> EHA105.....	11
4.3.2 Eletroporação de <i>R. radiobacter</i>	12
4.3.3 Realização do estoque em glicerol de <i>R. radiobacter</i>	12
4.3.4 Extração do DNA de <i>R. radiobacter</i> resistentes	13
4.3.5 Confirmação de <i>R. radiobacter</i> transformadas	13
4.4 INDUÇÃO DA SÍNTESE DE RBPSP-I EM <i>Nicotiana benthamiana</i>	13
4.4.1 Cultivo de <i>Nicotiana Benthamiana</i>	13
4.4.2 Agroinfiltração de <i>Nicotiana benthamiana</i>	14
4.5 EXTRAÇÃO PROTEICA DE FOLHAS DE <i>N. benthamiana</i>	15
4.6 PURIFICAÇÃO E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS PROTEICOS	16

4.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	16
4.6.2 Diálise	16
4.6.3 Liofilização.....	17
4.7 DETECÇÃO DA PROTEÍNA RBPSP-I	17
4.7.1 Quantificação da concentração de proteínas	17
4.7.2 Western Blot	17
4.8 ATIVIDADE FUNCIONAL	18
4.8.1 Atividade Fibrinogênolítica	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.1 CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS <i>E. coli</i>	18
5.2 CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO DE <i>R. radiobacter</i>	19
5.3 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS PROTEICOS	21
5.4 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA	22
5.5 WESTERN BLOT.....	22
5.6 ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA.....	23
6 CONCLUSÃO.....	25
7 REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui 405 espécies de serpentes (“Herpetologia Brasileira”, 2018), das quais, somente as pertencentes das Famílias Elapidae e Viperidae são peçonhentas (BERNARDE, 2011). Dentro da Família Viperidae, o gênero *Bothrops* é composto por aproximadamente 50 espécies de serpentes sendo o mais diverso é a Subfamília Crotalinae, e está presente em regiões geográficas distintas com uma extensa distribuição no território Centro e Sul Americano (BARBO et al., 2016; FENKER et al., 2014). No Brasil há, em média, 30 espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, as quais são importantes na herpetologia e no estudo epidemiológico dos acidentes ofídicos (BOCHNER; STRUCHINER, 2003; PINHO; PEREIRA, 2001).

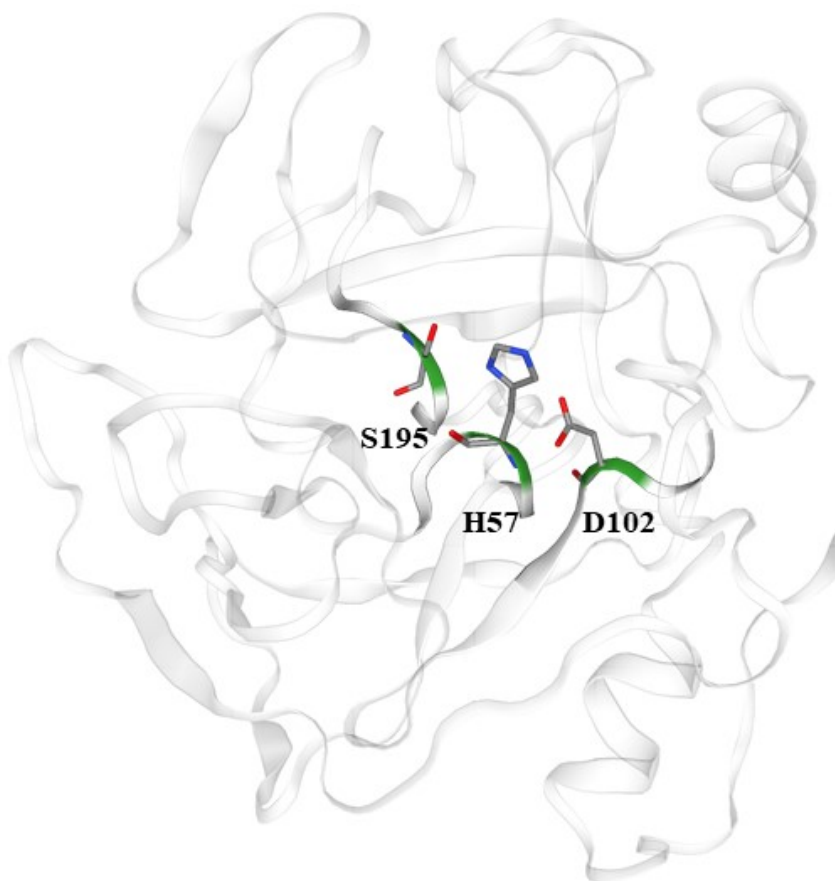
A composição bioquímica da peçonha ofídica pode variar tanto intraespecificamente quanto interespecificamente (QUEIROZ et al., 2008), porém, de modo geral, esse é composto principalmente por proteínas e peptídeos os quais atuam causando danos neurológicos, hemostáticos e citotóxicos (ALAPE-GIRÓN et al., 2008; CASEWELL et al., 2014). Os estudos de caracterização bioquímica da peçonha de algumas serpentes do gênero *Bothrops* demonstraram que 90 % de seu peso seco é composto por proteínas, com caráter enzimático ou não, como serinoproteases, metaloproteinases, lectinas tipo C e fosfolipases A2 (CUNHA; MARTINS, 2012).

A ação sinérgica de proteínas de peçonhas ofídicas potencializa seus efeitos hemotóxicos (DOLEY; KINI, 2009), ao causar o distúrbio da hemostasia tanto induzindo quanto suprimindo a coagulação sanguínea ao ativar ou inibir a agregação plaquetária e os fatores de coagulação, Fator Cinco (FV), Fator Dez (FX), Fator Sete (FVII), e Fator Dois (FII) (SAJEVIC; LEONARDI; KRIŽAJ, 2011). Desse modo, a peçonha pode afetar o sistema cardiovascular e renal (GUTIÉRREZ; ESCALANTE; RUCAVADO, 2009), assim como induzir acidentes vasculares cerebrais hemorrágicos (MACHADO et al., 2010).

Entre as proteínas presentes na peçonha de serpentes que afetam o equilíbrio hemostático, as serinoproteases formam um grupo intensamente pesquisado através dos anos devido seu interesse bioquímico e farmacológico (SERRANO, 2013). Como exemplo, cita-se o Batroxobin®, uma enzima isolada do veneno de *Bothrops atrox* utilizada no tratamento e prevenção de hemorragias e hemofiliais (DOS SANTOS; FORTES-DIAS; DOS SANTOS, [s.d.]).

As serinoproteases são um grupo de proteases hidrolíticas com grande diversidade estrutural e funcional cujo sítio catalítico é composto, majoritariamente, por resíduos de Serina (Ser), Histidina (His) e Aspartato (Asp), o qual catalisa a reação do grupo carbonil das proteínas (DI CERA, 2009; PAGE; DI CERA, 2008). É possível observar a estrutura tridimensional da proteína BjussuSP-1, uma serino protease *thrombin-like*, presente na peçonha da *Bothrops jararacussu* na Figura 1 (ULLAH et al., 2013).

Figura 1 - Estrutura da BjussuSP-1, uma serinoprotease *thrombin-like* da peçonha de *Bothrops jararacussu*. Estrutura tridimensional obtida por difração de Raio-X (2.60Å) da proteína *Jararacussin-I*, sendo destacado o sítio catalítico (Histidina-57, Aspartato-102 e Serina-195).

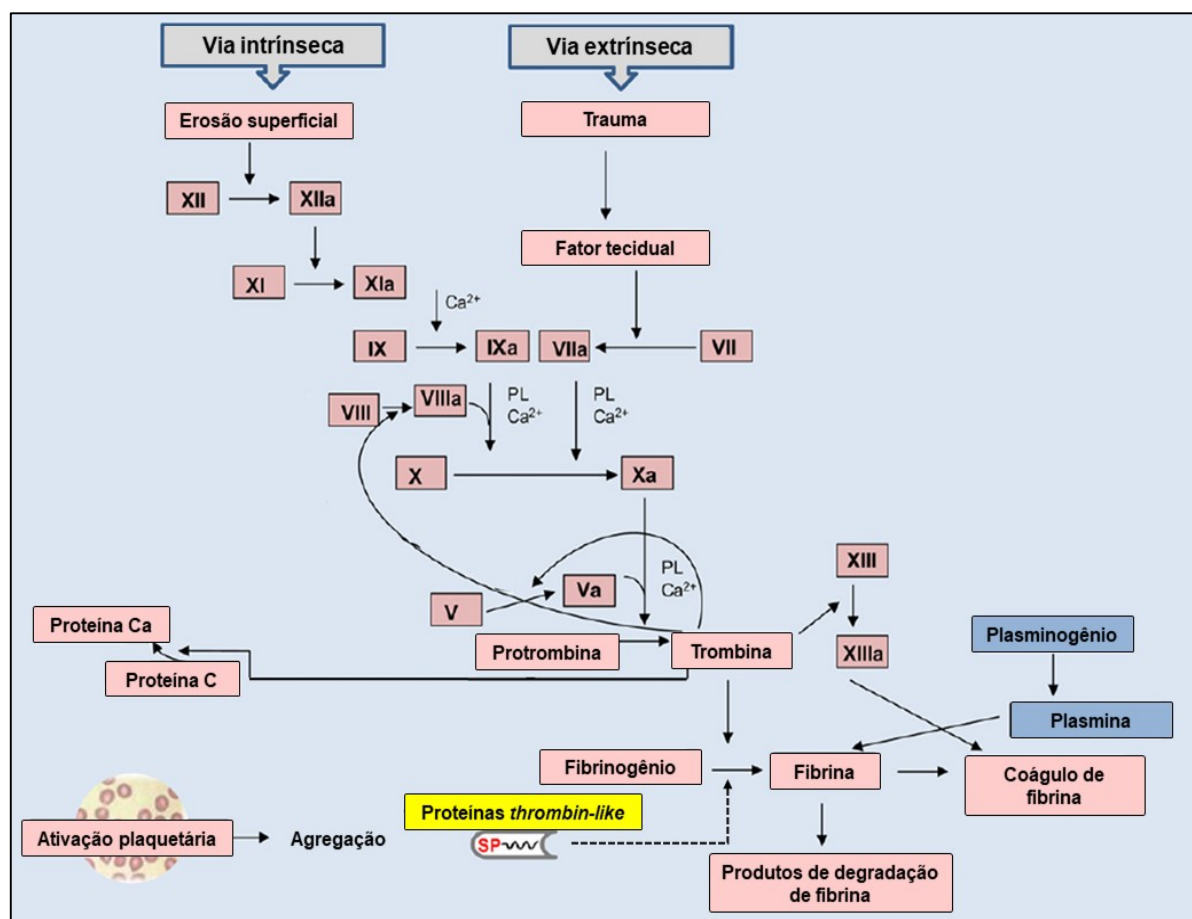


Adaptado de ULLAH et al.,2013.

Devido a diversidade estrutural das serinoproteases, esse grupo de enzimas também apresenta funcionalidades e alvos catalíticos diversos (HEDSTROM, 2002). Quanto aos seus efeitos sobre a hemostasia, as serinoproteases presentes na peçonha ofídica podem tanto induzir a coagulação sanguínea ao ativar o FV, quanto terem efeito anticoagulante ao ativarem a proteína C, que consequentemente, inibe o FVa (BRAUD; BON; WISNER, 2000).

Uma classe importante dessas enzimas, as serinoproteases *thrombin-like*, diferencia-se das demais por hidrolisar a cadeia α e/ou β do fibrinogênio, formando fibrina, ação semelhante a Trombina, tendo, portanto, ação coagulante (ULLAH et al., 2018), conforme pode ser visto na Figura 2, a qual apresenta a via de coagulação assim, como o efeito das serinoproteases *thrombin-like* sobre as vias fisiológicas de coagulação. Tais serinoproteases estão presentes principalmente em peçonhas de serpentes da Família Vipiridae e variam de funcionalidade e alvos na via de coagulação dependendo da espécie de onde a proteína é extraída (BRAUD; BON; WISNER, 2000).

Figura 2 - Esquema das vias fisiológicas de coagulação do sangue, assim como o local de ação da serinoprotease *thrombin-like*. Em amarelo destaca-se a serinoprotease *thrombin-like* agindo sobre o fibrinogênio ao hidrolisar a cadeia α e/ou β , formando fibrina e, consequentemente, os coágulos de fibrina e os produtos de degradação de fibrina.



Adaptado de SERRANO, 2013.

A análise proteômica da peçonha de *Bothrops pauloensis*, espécie de serpente típica da região do Cerrado brasileiro conhecida popularmente como "Jararaca pintada" (MACHADO;

SILVA; SILVA, 2014), demonstrou que serinoproteases compõem aproximadamente 10% de seus elementos proteicos, dentro dessas, as serinoproteases *thrombin-like* (RODRIGUES et al., 2012). O estudo das toxinas da peçonha de *Bothrops pauloensis*, especialmente de serinoproteases *thrombin-like*, possuem importância clínico científica devido potencial terapêutico desses compostos contra distúrbios hemostáticos (JABLAOUI et al., 2018; M. RODRIGUES et al., 2015).

O desenvolvimento recente de diversas áreas da biotecnologia facilitou a produção de proteínas recombinantes de modo a possibilitar a modificação, identificação, síntese e isolamento dessas biomoléculas em diversos tipos de organismos modelo (YOUNG; BRITTON; ROBINSON, 2012). Tal avanço, juntamente com o desenvolvimento de hibridomas, na década de 70, possibilitou a produção em larga escala de proteínas recombinantes farmacêuticas, denominados “biofármacos”, em diversos sistemas de expressão, tanto em organismos procariotos quanto em eucariotos, o que trouxe benefícios para o tratamento de doenças como o Diabetes tipo 1 e as Hemofilias tipo 1 e 2 (WALSH, 2013).

Há anos, algumas espécies de plantas, como o tabaco, têm sido utilizadas para a produção de proteínas heterólogas com potencial farmacêutico. Tal sistema apresenta como vantagens o custo de produção reduzido, a rápida escalabilidade e a possibilidade modificar a conformação de proteínas complexas com precisão (MA; DRAKE; CHRISTOU, 2003). As células vegetais modificadas geneticamente, desse modo, podem ser utilizadas como biorreatores para a síntese em larga escala de biofármacos e vacinas (DANIELL et al., 2009).

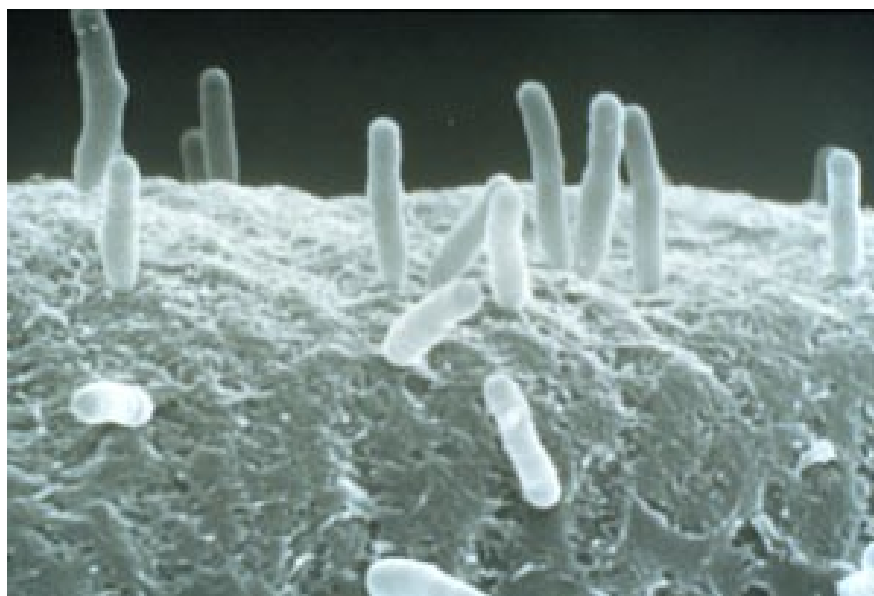
A expressão de proteínas recombinantes em organismos procariotos, como *Escherichia coli*, é bem determinada e amplamente utilizada, porém, é um sistema de expressão incapaz de sintetizar proteínas que necessitem de modificações pós-traducionais, como a glicosilação, para serem funcionais. Além disso, esses organismos produzem naturalmente endotoxinas, sendo mais uma desvantagem desse sistema de expressão heterólogo (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). Por outro lado, a síntese de proteínas recombinantes em organismos vegetais apresenta pequeno risco de contaminação e fácil adaptabilidade para sistemas em grande escala, além de ser um método barato e possibilitar a síntese de proteínas com modificações pós-traducionais (MA; DRAKE; CHRISTOU, 2003).

Além disso, também pode ser feita a expressão heteróloga transiente de proteínas terapêuticas e anticorpos monoclonais em organismos vegetais (KOMAROVA et al., 2010). Tal método de expressão de proteínas recombinantes em plantas transgênicas é rápido, flexível e

eficiente, podendo ser induzida em estágios de desenvolvimento avançados do organismo vegetal, sendo viável para produções em grandes escalas (LEUZINGER et al., 2013). Um dos métodos utilizados para realizar a transformação de plantas com genes heterólogos é a agroinfiltração à vácuo de bactérias *Rhizobium radiobacter* transformadas nas folhas das plantas, como o tabaco (FISCHER et al., 1999).

R. radiobacter é uma α -Proteobactéria, móvel, gram-negativa encontrada, tipicamente, no solo, e infecta diversas espécies vegetais, fixando-se e proliferando-se na superfície de raízes (GELVIN, 2018). Pode-se ver uma microscopia eletrônica de varredura da bactéria e sintomas de sua infecção nas Figuras 3 e 4, respectivamente. Tal bactéria é um organismo tumorigênico, devido a sua capacidade de introduzir segmentos de DNA bacterianos, presentes da região T do plasmídeo Ti, no genoma do hospedeiro, sendo esse processo mediado pelos componentes Vir, expressos pela Região Vir do plasmídeo Ti, que reconhecem da célula vegetal, estimulam a região gênica virulenta, transportam o T-DNA e o inserem no DNA da célula vegetal (GUO et al., 2019), conforme demonstrado na Figura 5.

Figura 3 - *R. radiobacter* fixada em uma célula vegetal. Fotografia de um Microscópio Eletrônico de Varredura demonstrando bactérias *R. radiobacter* fixadas a uma célula vegetal.



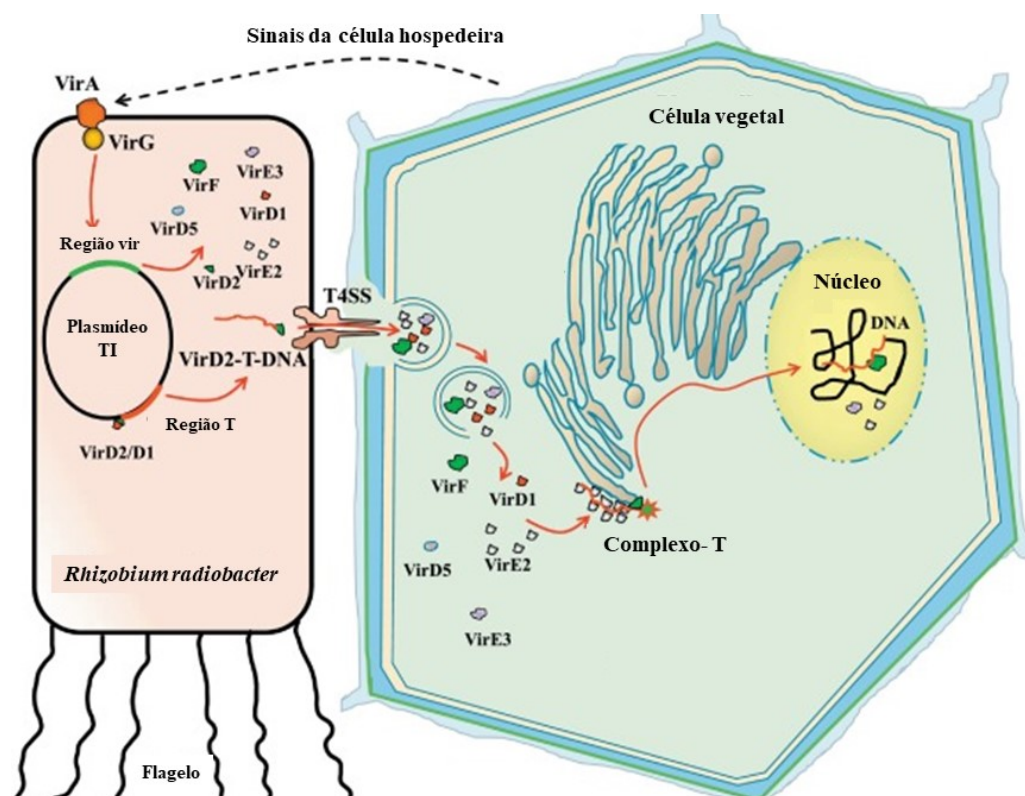
Fonte: “The Genome of *Agrobacterium tumefaciens*”, [s.d.]

Figura 4 - Sintoma da infecção de *R. radiobacter*. Fotografia de uma raiz de um espécie vegetal infectado com o *R. radiobacter*.



Fonte: “*Agrobacterium tumefaciens* – Plant Parasites of Europe”, [s.d.].

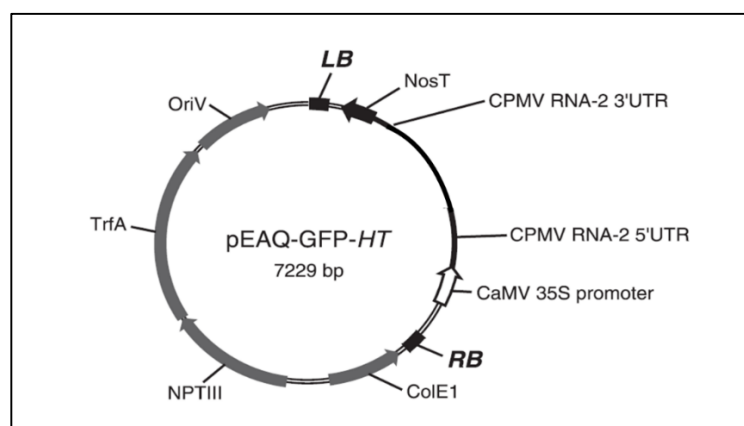
Figura 5 - Mecanismo de infecção *R. radiobacter*. Desenho esquemático demonstrando a bactéria *R. radiobacter* reconhecendo uma célula vegetal e ativando a Região Vir para a realizar a inserção da Região T no genoma da célula hospedeira.



Adapada de Guo et al.,2019.

Um dos vetores utilizados para a expressão transiente de proteínas recombinantes é o baseado no sistema de expressão hipertranslacional do vírus do mosaico de feijão-caupi “CPMV-HT” (do inglês *Cowpea Mosaic Virus hypertranslational*), denominado vetor pEAQ-HT, o qual possibilita a produção fácil, rápida e versátil de múltiplas proteínas recombinantes em plantas (PEYRET; LOMONOSSOFF, 2013; SAINSBURY; THUENEMANN; LOMONOSSOFF, 2009). Diversos estudos foram realizados visando a expressão e a caracterização de proteínas heterólogas transientes utilizando-se vetores pEAQ-HT, representado pela Figura 6, como exemplo, foi sintetizada a lipase gástrica humana (hGL) nas folhas da planta de *Nicotiana benthamiana* através do sistema CPMV-HT e observou-se produção eficiente, possível de ser feita em larga escala (VARDAKOU et al., 2012).

Figura 6 - Ilustração esquemática do vetor PEAQ-HT. Construção gênica do vetor no plasmídeo pEAQ-HT, contendo a região promotora, onde inicia-se a transcrição gênica; peptídeo sinal gene de interesse, que direciona a proteína sintetizada para uma organela celular; Origem de replicação, região onde a dupla hélice é aberta, permitindo a replicação; genes de resistência à antibióticos, os quais expressam proteínas que inibem a ação de antibióticos específicos para a seleção de micro-organismos.



Adaptado de SAINSBURY; THUENEMANN; LOMONOSSOFF, 2009

Para a síntese eficaz e otimizada de proteínas heterólogas em *N. Benthamiana* faz-se necessário a utilização da proteína P19 *Artichoke Mottled Crinckle virus* (AMCV) que atua como supressor viral de silenciamento de genes. Estudos anteriores comprovaram o efeito do P19 sobre a síntese do antígeno Nef do HIV-1 a partir da co-agroinfiltração a vácuo foi benéfico sobre os níveis de expressão (CIRCELLI et al., 2010). Outro fator otimizador do sistema de expressão heterólogo em espécies vegetais é a sequência peptídica RAMY 3D SP codifica um peptídeo sinal da alfa-amilase do arroz, endereçando a proteína recombinante aos cloroplastos e / ou amiloplastos, evitando, assim a sua degradação e desativação (CHEN et al., 2004).

2 JUSTIFICATIVA

A hemofilia é um distúrbio hemorrágico congênito, sendo classificado em dois tipos: hemofilia A, quando há deficiência do fator de coagulação oito (FVIII); ou hemofilia B, causada pela deficiência do fator de coagulação nove (FIX). Tal distúrbio é devido a mutações nos respectivos genes dos fatores de coagulação (SRIVASTAVA et al., 2013). A doença possui importância clínica tanto nacionalmente, afetando cerca de um em cada dez mil indivíduos do sexo masculino no Brasil (CAIO et al., 2001), quanto internacionalmente, já que estima-se que,

nos EUA, 13.320 casos de hemofilia A e 3.640 casos de hemofilia B no período de um ano (SOUCIE; EVATT; JACKSON, 1998).

Tal doença pode causar hemorragias do sistema nervoso central, gastrointestinal aguda, renal, oral, etc.. (SRIVASTAVA et al., 2013). O tratamento da hemofilia consiste na prevenção e controle de sangramentos por agentes de *bypassing*, como o complexo protrombínico (CCPs) e o FVII recombinante ativado, os quais estimulam a coagulação sanguínea, causando o equilíbrio hemostático através da geração de trombina (DARGAUD et al., 2018).

Haja vista que a serinos proteases *thrombin-like* possuem ação coagulante (SERRANO, 2013), como descrito anteriormente, diz-se que tais proteínas podem ser um possíveis fármacos para o tratamento de hemofilias. Além disso, já foi comprovado que a peçonha ofídica é uma fonte de possíveis proteínas farmacêuticas, visto que existem biofármacos de ação coagulante cujo princípio ativo são as serinoproteases, como o Vivostat®, isolado da peçonha de *Bothrops moojeni* e o Batroxobin, isolado da *Bothrops atrox* (WAHEED; MOIN; CHOUDHARY, 2017). Desse modo, a serino protease *thrombin-like* presente na peçonha de *Bothrops pauloensis* é uma proteína que possui potencial farmacológico para o tratamento de hemofilias.

A serino protease *thrombin-like* presente na peçonha de *Bothrops pauloensis* foi anteriormente expressa em *P. pastoris* e apresentou uma baixa atividade proteolítica sobre o substrato cromogênico, algo que ocorreu devido as glicosilações presentes na estrutura tridimensional da proteína recombinante (ISABEL et al., 2016). O resultado funcional da proteína recombinante se deve ao alto teor glicosilação realizado pela levedura, tornando esse organismo modelo inadequado para certas proteínas recombinantes, sendo uma limitação importante para sistemas de expressão de proteína à base de levedura (BRETTHAUER; CASTELLINO, 1999; HAMILTON; GERNGROSS, 2007), indicando-se a expressão desta protease em outro organismo modelo.

Por isso, indica-se a expressão transiente de uma serinoprotease recombinante da peçonha da jararaca pintada em plantas, como uma alternativa de síntese de tal enzima eficiente para grande escala e de baixo custo, de modo a possibilitar o desenvolvimento de um fármaco para distúrbios hemostáticos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Este estudo objetivou expressar a serinoprotease thrombin-like sintética de *Bothrops pauloensis* em *Nicotiana benthamiana*, além de realizar a caracterização parcial funcional da enzima recombinante.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

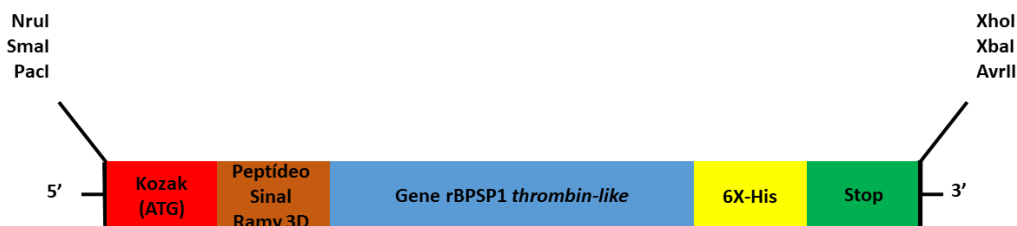
- Realizar a transformação de bactérias *R. radiobacter* com o gene de interesse introzido no vetor de expressão;
- Expressar a serinoprotease recombinante da peçonha de *Bothrops pauloensis* em *Nicotiana benthamiana*;
- Extrair a serinoprotease recombinante da das folhas de *Nicotiana benthamiana*;
- Purificar o extrato proteico das folhas de *Nicotiana benthamiana*;
- Quantificar o conteúdo proteico de extratos proteicos e materiais purificados de folhas de *Nicotiana benthamiana*;
- Detectar a serinoprotease recombinante em extratos proteicos e materiais purificados de folhas de *Nicotiana benthamiana*;
- Analisar o efeito da serinoprotease recombinante sobre o fibrinogênio.

4 METODOLOGIA

4.1 CONSTRUCTO GÊNICO DA SEQUÊNCIA DE INTERESSE

O gene de interesse foi esquematizado e sintetizado de acordo com a Figura 7.

Figura 7 - Esquema da rBPSP-1. Os sítios para as enzimas de restrição NruI, SmaI, PacI, XhoI, XbaI e AvrII nas extremidades esquerda e direita do esquema, em vermelho está representada a sequência Kozak e o códon inicial (ATG), em marrom tem-se representado o peptídeo sinal para direcionamento da proteína para o apoplasto do vegetal; em azul o gene da proteína de interesse; em amarelo o peptídeo HIS (6X) e em verde o Stop Codon para tradução da proteína (TGA).



Depois de sintetizado, o vetor foi eletroporado em bactérias *Escherichia coli* DH5a (Invitrogen, USA) eletrocompetentes para que ocorra sua replicação e posterior extração.

4.2 CLONAGEM DE BACTÉRIAS *E. coli* DH5A ELETROPORADAS COM GENE DE INTERESSE INSERIDO NO VETOR PEAQ-HT

4.2.1 Confirmação da transformação das bactérias *E. coli* eletroporadas

Realizou-se o cultivo de bactérias *E. coli* DH5a eletroporadas com gene de interesse inserido no vetor pEAQ-HT em 5 ml de meio LB (Luria Bertani) líquido contendo antibiótico, Canamicina (50 µg/µl), por 24 horas a 37°C sob agitação. Posteriormente, realizou-se a extração do material genético das colônias resistentes através do QIAprep® Spin Miniprep Kit (250) (*Quiagen*), seguindo as instruções de protocolo indicadas pelo fabricante. O DNA extraído foi quantificado pelo método de espectrofotometria através do NanoDrop™ 1000 (*Thermo Scientific*).

Para confirmar a transformação das bactérias *E. coli* DH5a eletroporadas com gene de interesse inserido no vetor pEAQ-HT realizou-se uma PCR (do inglês, *Polimerase Chain Reaction*) com o material genético obtido, na qual foram adicionados 5 µl de DNA genômico a 100 mM, 7 µl GoTaq® Master Mixes (*Promega*), 1 µl de Primer FW (5'-CGTTGGAGGAGATGAGTGTAAG-3'), e 1 µl de primer RV (5'-GGCAATGTAAGTGGAGCAATATG-3'), para cada reação conduzida. No controle negativo, foram aplicados 5 µl de água, substituindo a alíquota de DNA genômico. Ajustou-se os ciclos de PCR de modo a ter-se: 4 minutos a 95°C de desnaturação por uma vez, 35 ciclos de desnaturação, anelamento e polimerização com temperaturas de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e um minuto a 72°C, respectivamente, seguidos de 5 minutos a 72°C.

Posteriormente, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 1,5% do material amplificado na PCR a 100 voltz por tempo variável, sendo aplicados no gel 10 µl de material homogeneizados a 2 µl de Gelred™ (*Uniscience*) 0,002%. Utilizou-se o Marcador de Peso

Molecular 100pb DNA Ladder (*Ludwig Biotec*) também homogeneizado ao corante fluorescente de ácidos nucleicos.

4.3 TRANSFORMAÇÃO DE *R. radiobacter*

4.3.1 Produção de células eletrocompetentes de *R. radiobacter* EHA105

Para realizar a produção de células eletrocompetentes de *R. radiobacter* EHA105 inoculou-se 2 µL das células não-competentes providas do estoque em glicerol em 5ml de meio LB líquido *overnight* a 28°C sob agitação. Posteriormente, 2 ml dessa suspensão foram inoculados em 500ml de meio LB líquido a 28°C até este atingir OD de 0,3. Transferiu-se a suspensão para tubos estéreis, os quais foram colocados em gelo por 30 minutos, e seguidamente centrifugados a 4667 xg a 4°C por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante.

Ressuspendeu-se os *pellets* obtidos de cada tubo no mesmo volume em que a suspensão se encontrava antes da centrifugação, volume inicial, com água mili-Q gelada autoclavada. A suspensão obtida foi centrifugada a 4667 xg a 4°C por 10 minutos e seu sobrenadante foi, posteriormente, descartado. Após repetir tal procedimento, ressuspendeu-se o *pellet* resultante seguindo a proporção de 1/10 do volume inicial em água mili-Q gelada autoclavada. A suspensão foi centrifugada conforme as condições anteriores sendo descartado o sobrenadante e ressuspendido o *pellet* em 2ml de glicerol 10%. As alíquotas obtidas foram estocadas a -80°C.

4.3.2 Eletroporação de *R. radiobacter*

Ressuspendeu-se 3µL de cada amostra de DNA extraídas de diferentes colônias de células de *E. coli* transformadas, com concentração de 60 ng/µL, em diferentes alíquotas de 2ml de células de *R. radiobacter* eletrocompetentes. Posteriormente, eletroporou-se cada suspensão com choque de pulso de 1,7kV, e inoculou-se tal suspensão em meio LB líquido a 28°C por 30 minutos sob agitação. Plaqueou-se as células em meio LB sólido contendo Canamicina sob a concentração de 50ng/µL. As placas foram deixadas sob a temperatura de 28°C por dois dias.

Concomitantemente, foram eletroporadas, sob as mesmas condições anteriores, bactérias *R. radiobacter* eletrocompetentes com o vetor auxiliar p19.

4.3.3 Realização do estoque em glicerol de *R. radiobacter*

As colônias resistentes plaqueadas em meio LB sólido foram selecionadas e inoculadas em meio 5ml LB Líquido contendo Rifampicina (50 µg/µl), Tetraciclina (10 µg/µl) e Canamicina

(50 µg/µl) a 28°C sob agitação por dois dias. Posteriormente, ressuspendeu-se 500 µl da suspensão celular de *R. radiobacter* das colônias líquidas resistentes em 500 µl glicerol. Armazenou-se tais estoques a -80°C.

4.3.4 Extração do DNA de *R. radiobacter* resistentes

Inoculou-se, a partir dos estoques em glicerol, colônias de *R. radiobacter* em Meio LB líquido contendo Rifampicina (50 µg/µl), Tetraciclina (10 µg/µl) e Canamicina (50 µg/µl) a 28°C sob agitação por 24h. Posteriormente, centrifugou-se 1,5 ml da cultura a 13300 xg por 2 min e descartou-se o sobrenadante.

Ressuspendeu-se o *pellet* obtido em Tampão I (NaCl 0,2M em Tris-EDTA), centrifugou-se a solução e descartou-se sobrenadante. Repetiu-se o processo anterior e solubilizou-se o *pellet* obtido em 200 µl de Tampão I diluídos em 200 uL de Solução I (NaOH 2M; Dodecil Sulfato de Sódio 1% (SDS)). A solução foi mantida em gelo por 15 min. Posteriormente, adicionou-se 150 µl de Acetato de Sódio 3M gelado e manteve-se a mistura no gelo por 30 min. Centrifugou-se os tubos por 15 min 13300 xg a T.A..

Transferiu-se o sobrenadante a um novo tubo e adicionou-se 900 µl de Etanol. A solução foi mantida a -20°C por 1 hora e, posteriormente, foi centrifugada a 13300 xg a T.A. por 30 min. Descartou-se o sobrenadante e lavou o precipitado com 400 µl de Etanol 70 % e centrifugou-se os tubos por 2 min de acordo com as condições anteriores. Descartou-se o Etanol remanescente na solução e ressuspendeu-se o precipitado em 20 µl de água deionizada esterilizada.

4.3.5 Confirmação de *R. radiobacter* transformadas

O DNA extraído das colônias resistentes de *R. radiobacter* foi aplicado a uma PCR, nas mesmas condições dispostas no item 4.2.1, seguida de uma eletroforese, para confirmar a transformação.

4.4 INDUÇÃO DA SÍNTESE DE rBPSP-I EM *Nicotiana benthamiana*

4.4.1 Cultivo de *Nicotiana Benthamiana*

As plantas de *Nicotiana benthamiana* foram crescidas em sob fotoperíodo de 16 horas de claro e 8 horas de escuro em ambiente fechado sob a emissão de luz de LED. A foto de uma planta de *N. benthamiana* pode ser vista na Figura 8.

Figura 8 - Fotografia de uma planta da espécie *Nicotiana benthamiana*. Planta de *N. benthamiana* com seis semanas crescida em ambiente fechado sob o período de claro e escuro de 16:8 horas.



4.4.2 Agroeinfiltração de *Nicotiana benthamiana*

Inoculou-se 3 μ l de cada estoque em glicerol de *R. radiobacter* com transformação confirmada em 20 ml de meio LB líquido contendo antibióticos Rifampicina (50 μ g/ μ l), Tetraciclina (10 μ g/ μ l) e Canamicina (50 μ g/ μ l) por 48h a 28°C sob agitação. Concomitantemente, inoculou-se, nas mesmas condições, colônias de *R. radiobacter* contendo o vetor auxiliar p19.

Após a verificação do crescimento das colônias, realizou-se a peletização de cada material a 5900 $\times$ g a Temperatura Ambiente (T.A.) por 12 min. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado celular em 500 μ l de Tampão MESMgCl₂ (MES 10mM, MgCl₂ 10mM). Posteriormente, centrifugou-se novamente a mistura a 5900 $\times$ g a T.A. por 2 min e ressuspendeu-se o *pellet* obtido em 500 μ l de Tampão MESMgCl₂. Repetiu-se o processo anterior uma vez.

Realizou-se a medida de Densidade Ótica (OD) das bactérias em um comprimento de onda de 600 nm por espectrofotometria. Após a medição, realizou-se a diluição dos concentrados celulares de bactérias transformadas com o gene da rBPSP-I em Tampão MESMgCl₂, formando culturas bacterianas com OD de 0,2. Adicionou-se bactérias transformadas com o vetor p19 em cada constructo com o gene de interesse de modo a obter uma OD final de 0,4. A acetoseringona 100 mM foi adicionada seguindo a proporção de 1 µl de acetoseringona para 1 ml de constructo. Infiltrou-se folhas de *Nicotiana benthamiana* por pressão de seringa, método que pode ser visto na Figura 9.

Figura 9 - Planta da espécie *Nicotiana benthamiana* sendo Agroinfiltrada. Planta de *Nicotiana benthamiana* sendo Agroinfiltrada com os respectivos constructos de *R. radiobacter* pelo método de pressão por seringa na região da folha.



Fonte: GECHELE et al., 2015

Após o período de 4 dias, sendo o dia zero o dia da infiltração, coletou-se as folhas de *Nicotiana benthamiana* infiltradas assim como folhas de *N. benthamiana* não infiltradas, os quais configuram o grupo controle (WT, do inglês *Wild Type*).

4.5 EXTRAÇÃO PROTEICA DE FOLHAS DE *N. benthamiana*

Realizou-se a extração proteica do material vegetal a partir da maceração em nitrogênio líquido das folhas de *N. benthamiana* coletadas.

Após, homogeneizou-se o produto de maceração obtido em Tampão de Extração (Tris HCl 0,05 M, Triton X-100 1%, NaCl 0,075 M, Glicerol 70% e EDTA 0,002 M). Cada material foi vortexado por um minuto seis vezes, tendo descansos de um minuto em gelo entre as vortexações. Posteriormente, sonicou-se cada amostra seis vezes de 30 segundos a uma amplitude de 50 %, tendo um intervalo de um minuto no gelo entre as sonicações. Finalmente, centrifugou-se as amostras por 30 min a 4° C a 9340 *xg* e descartou-se o *pellet* obtido. Os extratos proteicos foram armazenados a - 4°C.

4.6 PURIFICAÇÃO E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS PROTEICOS

4.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para a realização das purificações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), utilizou-se a coluna His Trap TM HP 5 ml (*GE Healthcare*). Primeiramente, equilibrou-se a coluna com Tampão *Binding* (20mM de Fosfato de Sódio, 0,5 M de NaCl, 20mM de Imidazol), o qual formou da Linha Base da corrida de purificação. Posteriormente, foram aplicadas, a cada corrida, 20 ml para cada amostra purificada, seguida pela segunda aplicação do Tampão *Binding* até que houvesse novamente o equilíbrio da coluna. Após a estabilização da leitura na Linha Base, foi aplicado o Tampão de Eluição (20mM de Fosfato de Sódio, 0,5 M de NaCl, 500mM de Imidazol) até que houvesse o pico referente as proteínas anteriormente ligadas a coluna, havendo a coleta em tubos falcom separados do material purificado.

4.6.2 Diálise

Para realizar a diminuição do conteúdo salino dos conteúdos purificados, amarrou-se sobre as aberturas dos tubos contendo os produtos da purificação por HPLC membranas Spectra/Por® Dialysis Menbrane MWCO 6 1000 (*Fisher Scientific*) pré-hidratadas. Os tubos foram postos de modo que as membranas ficassem submersas em água MiliQ por dois dias sob a temperatura de -4°C com agitação por agitador magnético. A água MiliQ foi trocada a cada 12 horas.

4.6.3 Liofilização

Os produtos da diálise foram congelados em Nitrogênio líquido e colocados no liofilizador a - 34°C a uma pressão de aproximadamente 340 μ m de Mercúrio por 48 horas, até que o conteúdo úmido fosse retirado das amostras. Após a liofilização as amostras foram ressuspensas em água MiliQ.

4.7 DETECÇÃO DA PROTEÍNA rBPSP-I

4.7.1 Quantificação da concentração de proteínas

A concentração proteica obtida do purificado ressuspendido foi quantificada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976). Primeiramente, fez-se a diluição seriada de um estoque de Albumina de Soro Bovino (BSA) 200 µg/µl, obtendo-se 6 alíquotas de 200 µl de cada ponto de concentração proteica. Foram ressuspendidos 50 µl de cada alíquota em 250 µl de Reagente de Bradford (*Sigma-Aldrich*) em uma placa de 96 poços. Os dados obtidos a partir da leitura da placa por espectofotometria a um comprimento de onda de 595 nm foram plotados e linearizados de modo a obter uma curva padrão que os relaciona ao de gradiente de concentração proteica.

Posteriormente, ressuspendeu-se alíquotas de volume variável das amostras purificadas e ressuspendidas em água MiliQ em 250 µl de reagente de Bradford, os quais foram lidos por espectofotometria nas condições anteriores. As leituras foram plotadas e comparadas à curva padrão obtendo-se a concentração proteica de cada amostra.

4.7.2 Western Blot

Realizou-se um western-blot para confirmar a identidade da proteína estudada. Foram avaliadas as seguintes amostras: extrato proteico total do material selvagem (4,7 µg), extrato proteico bruto rSBP-I (3,2 µg), Purificado proteico do material selvagem (0,1323 µg) e, o Purificado proteico rSBP-I (0,098 µg). A eletroforese por SDS-PAGE 12,5% foi feita sob condições desnaturantes, fazendo o empacotamento das proteínas a 80 voltz por 30 minutos e 100 voltz para a separação, por tempo variável, sendo aplicados 21 µl de cada amostra analisada diluídas em 7 µl de tampão de amostra (β-mercaptoetanol 4%, Azul de Bromefenol 0,2%, água MiliQ, Glicerol 10 %, SDS 4%, Tris HCl 1 M) as quais foram previamente aquecidas a 100°C por 5 min. Utilizou-se como marcador molecular o PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (*ThermoFisher Scientific*), utilizado para proteínas de 10 a 250kDa. Posteriormente, realizou-se a transferência das proteínas dispostas no gel à membrana de nitrocelulose Amersham™2 Prontan™ 0.2 µm (*GE Healthcare*) a 50 mA, *overnight*.

Após a transferência, realizou-se o método de Western blot. Para tal, fez-se a marcação de bandas proteicas com a solução Ponceau, seguida de uma lavagem com água destilada. Posteriormente, fez-se o bloqueio imergindo a membrana em solução de Tampão Fosfato (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*) com leite em pó comercial (PBS, leite em pó 3%) por uma hora a T.A. sob agitação. Após o bloqueio, realizou-se a cinco lavagens de cinco minutos

com a solução PBS-Tween (PBS, Tween 0,05%) com agitação a T.A., as quais foram seguidas pela incubação com o anticorpo primário não-conjugado Anti-His Antibody (*GE Healthcare*), diluído na proporção de 1:1000 na solução PBS-leite em pó, nas mesmas condições de temperatura e agitação. Após, realizou-se as lavagens da membrana, conforme descrito anteriormente, e a incubação do anticorpo secundário *Anti-mouse* IgG conjugado a peroxidase, diluído na proporção 1:2000 em PBS-leite em pó, por uma hora sob agitação e T.A., seguido pelo procedimento de lavagem.

Seguidamente, fez-se a revelação com peroxidase sendo utilizadas as soluções de revelação (*Amersham ECL star Western Blotting Detection Reagent - GE Life Sciences*). A reação foi realizada em uma câmara escura onde as duas soluções de revelação foram misturadas e colocadas sobre a membrana por aproximadamente 2 minutos. Posteriormente, envolveu-se a membrana em um cassete de autorradiografia junto a um filme (*Amersham Hyperfilm ECL - GE Life Sciences*) que foi posteriormente revelado utilizando as soluções reveladora e fixadora (*Kodak*).

A massa molecular da proteína foi estimada através da relação linear logarítma entre a massa molecular e a distância de migração, obtidos pela separação das bandas proteicas do marcador molecular.

4.8 ATIVIDADE FUNCIONAL

4.8.1 Atividade Fibrinogenolítica

Incubou-se 20µg de cada amostra, provindas do extrato proteico das folhas de *N. benthamiana*, com 50µg de fibrinogênio nos períodos de 5, 10, 30, 60 e 120 minutos a 37°C, sendo a reação parada através da adição de 25 µl de uma solução contendo 0.06 M TrisHCl, SDS 2%, glicerol 10%, b- mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.05%. Posteriormente, realizou-se uma eletroforese em SDS-PAGE 12.5% sob condições desnaturantes, como descrito anteriormente. Utilizou-se marcador molecular LMW o qual apresenta as massas moleculares de 97, 66, 45, 30, 20.1, 14,4 kDa (*Amersham Biosciences*).

Após, o gel foi imerso em Solução Fixadora (Etanol 40%, Ácido acético 10%) por 30 minutos e depois pela Solução Corante (Sulfato de amônio 8%, Ácido fosfórico 0,8%, Comassie Blue 0,08%, Metanol 30%) *overnight*. Posteriormente, o gel foi descorado com ácido acético 20% por 15 minutos sob agitação.

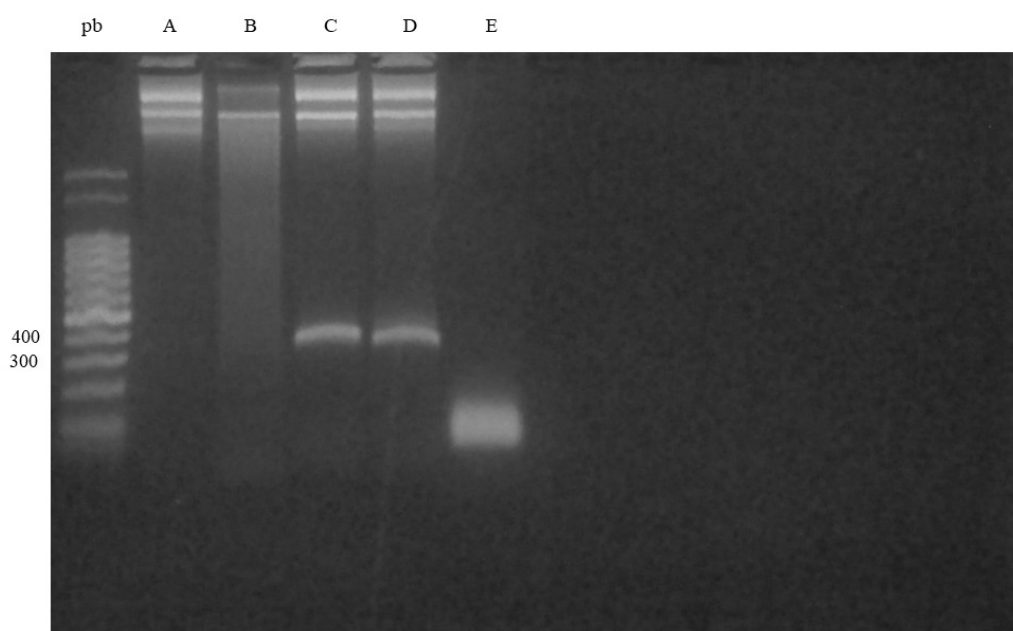
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS *E. coli*

O resultado referente a transformação de bactérias *E. coli* DH5 α pode ser visto na Figura 10, a qual confirma a transformação das colônias 1 e 6 com o material genético da sequência de interesse, haja vista o aparecimento de bandas com aproximadamente 378 pares de bases, tamanho similar ao amplicom entre os primers Forward e Reverse, cujo tamanho é estimado a ser de 321 pares de bases.

Figura 10 - Produto da PCR de DNA genômico de *E.coli* DH5 α para o gene rBPSP-I.

Fotografia de um gel de agarose 1,5%, visualizado em transiluminador. bp: Padrão de pb 1Kb Plus DNA Ladder (*Invitrogen*); A: Resultado da PCR para a amplificação do gene rBPSP-I da colônia 3. B: Resultado da PCR para a amplificação do gene rBPSP-I da colônia 2. C: Resultado da PCR para a amplificação do gene rBPSP-I da colônia 1. D: Resultado da PCR para a amplificação do gene rBPSP-I da colônia 6. E: Resultado da PCR para a amplificação do gene rBPSP-I para o Controle negativo (água).

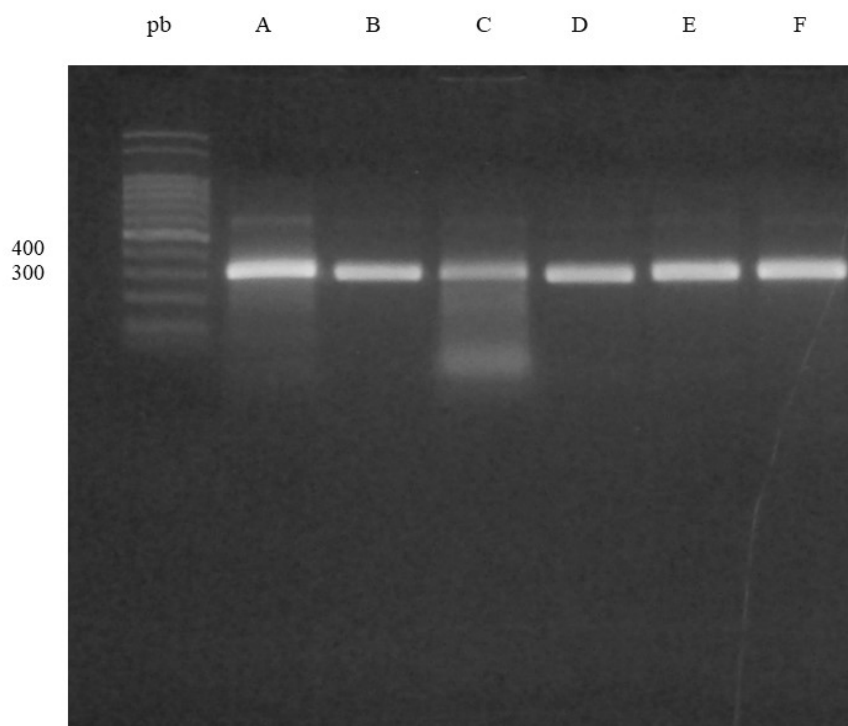


5.2 CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO DE *R. radiobacter*

Após a confirmação da transformação das *E.coli* DH5 α com o gene rBPSP-I, prossedeu-se as etapas contidas no item 4.3, ou seja os protocolos de transformação de *R. radiobacter*, para a posterior confirmação dessa transformação.

O resultado referente a transformação de bactérias *R. radiobacter* EHA105 pode ser visto na Figura 11, a qual confirma a transformação das colônias 1, 2, 3, 4, 5 e 6 com o material genético da sequência de interesse, haja vista o aparecimento de bandas com aproximadamente 314 pares de bases, tamanho similar ao amplicom entre os primers Forward e Reverse, cujo tamanho é estimado a ser de 321 pares de bases.

Figura 11 - Produto da PCR de DNA genômico de *R. radiobacter* EHA105 para o gene rBPSP-I. Fotografia de um gel de agarose 1,5%, visualizado em transiluminador. bp: Padrão de pb 1Kb Plus DNA Ladder (*Invitrogen*); A: Resultado da PCR para a amplificação do gene rBPSP-I da colônia 1. B: Resultado da PCR para a amplificação do gene rBPSP-I da colônia 2. C: Resultado da PCR para a amplificação do gene rBPSP-I da colônia 3. D: Resultado da PCR para a amplificação do gene rBPSP-I da colônia 4. E: Resultado da PCR para a amplificação do gene rBPSP-I da colônia 5. F: Resultado da PCR para a amplificação do gene rBPSP-I da colônia 6.

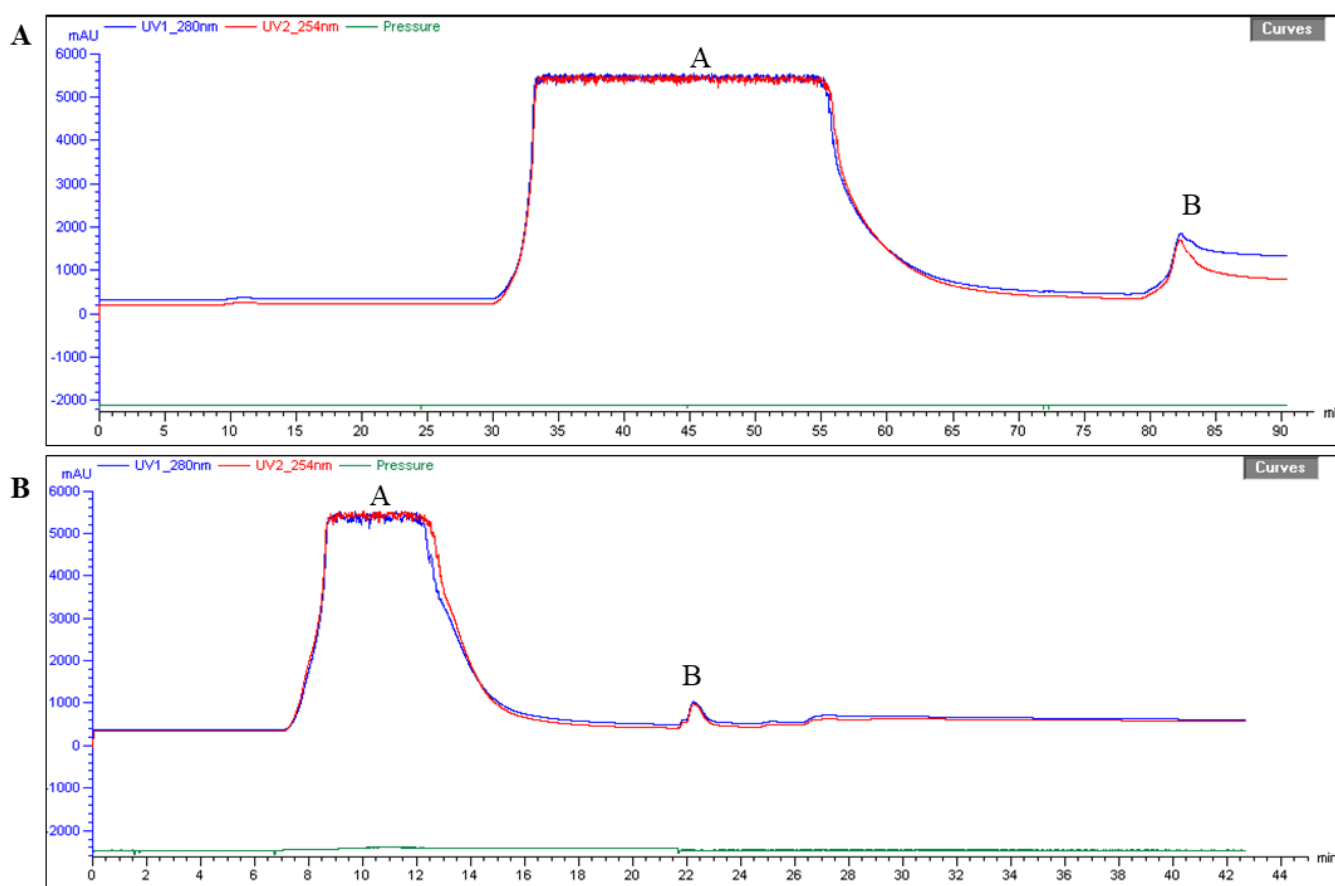


5.3 PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS PROTEICOS

Após a confirmação da transformação das *R. radiobacter* EHA105 com o gene rBPSP-I, procedeu-se os protocolos de agroinfiltração e extração proteica, conforme descritos, respectivamente nos itens 4.4.2 e 4.5. Com a obtenção dos extratos proteicos, realizou-se a purificação de tais extratos por HPLC, conforme descrito no item 4.6.1.

Como resultado das purificações por HPLC, obteve-se os perfis de corrida cromatográfica, os quais demonstraram a ligação de proteínas ligantes a coluna de níquel, tanto nos extratos proteicos de folhas infiltradas quanto das de plantas selvagens.

Figura 12 - A. Perfil da purificação por HPLC do extrato proteico rBPSP-I da corrida cromatográfica 1. A: Proteínas não ligantes a coluna de níquel. B: proteínas ligantes a coluna de níquel. B. Perfil da purificação por HPLC do material selvagem da corrida cromatográfica 1. A: Proteínas não ligantes a coluna de níquel. B: proteínas ligantes a coluna de níquel.



Posteriormente, realizou-se os protocolos de concentração proteica conforme nos itens 4.6.1 e 4.6.2, os quais foram seguidos pela quantificação proteica.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA

Tanto os extratos quanto os purificados proteicos foram quantificados pelo método de Bradford, cujo resultado das leituras e da posterior quantificação da concentração proteica pode ser visto conforme na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados obtidos a partir do protocolo de Bradford

Amostras	Leituras		Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Extrato proteico do material selvagem	0,196	0,245	0,225
Extrato proteico rSBP-I	0,151	0,153	0,152
Purificado proteico do material selvagem	0,058	0,068	0,0063
Purificado proteico rSBP-I	0,042	0,052	0,0047

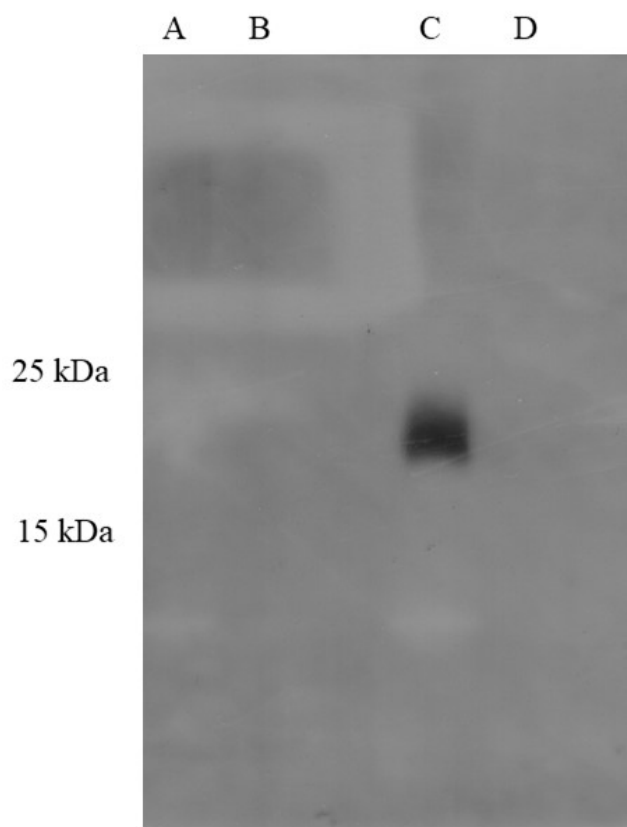
O resultado demonstra a que houve baixa concentração proteica nos materiais purificados, algo não observado nos extratos proteicos. Desse modo, pode-se dizer que houve perda de conteúdo proteico nas etapas posteriores a de purificação, haja vista que, conforme descrito no item 5.3, foi possível observar a presença de conteúdo proteico pelas corridas cromatográficas.

5.5 WESTERN BLOT

O resultado referente ao Western Blot realizado com o material selvagem (extrato proteico e purificado proteico de folhas não agroinfiltradas) e com os tratamentos (extrato proteico e purificado proteico de folhas agroinfiltradas com a sequência da proteína rBPSP-I) pode ser visto na Figura 13. A partir desse procedimento, foi possível perceber presença de uma proteína no extrato proteico agroinfiltrado com massa de, aproximadamente, 21 kDa, a qual não foi presente no extrato proteico do material selvagem. Devido ao fato da massa molecular da banda ser menor em relação a massa estimada da rSBP-I, de 28 kDa, não é possível afirmar que a proteína detectada pelo Western Blot é a de interesse, necessitando de experimentos futuros para tal confirmação.

Além disso, não observou-se a presença da proteína de 21kDa no purificado proteico rSBP-I, proteína observada no extrato proteico do mesmo material, assim como no purificado selvagem. Tal resultado pode ser explicado pela baixa quantidade de proteínas dessa amostra aplicadas no SDS-PAGE impossibilitando a visualização de bandas no western-blot.

Figura 13 - Detecção da rBPSP-I por Western-blot. A: Extrato proteico material selvagem. B: Extrato proteico purificado do material selvagem. C: Extrato Proteico rBPSP-I. D: Extrato proteico purificado do rBPSP-I.



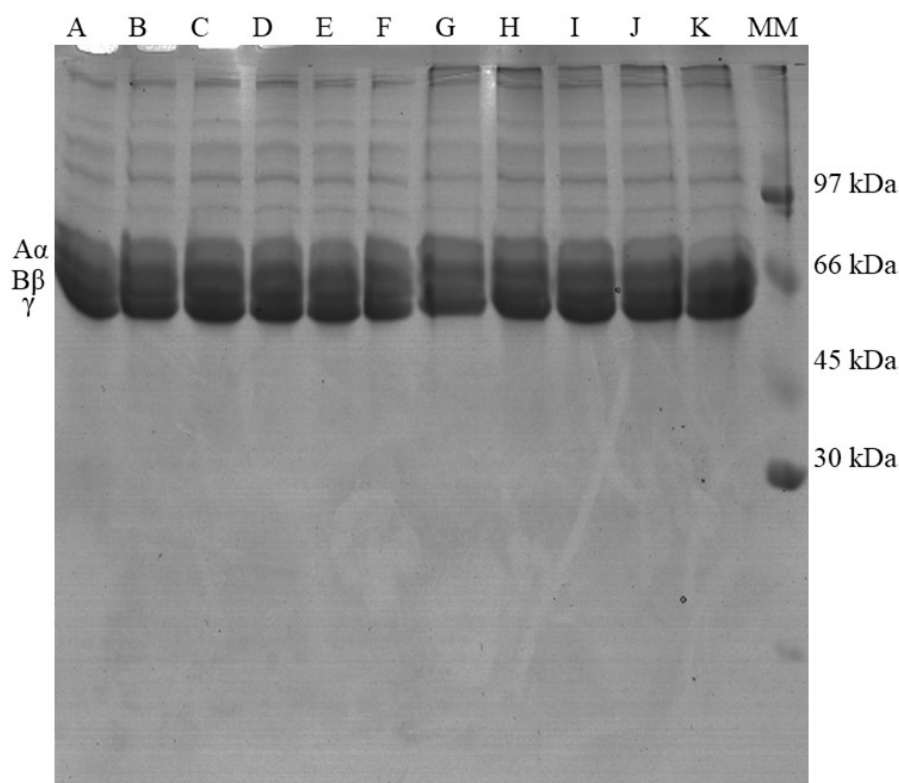
5.6 ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA

A partir do resultado pelo ensaio de atividade fibrinogenolítica, foi possível observar uma degradação da cadeia A α do fibrinogênio a partir de 60 minutos no tratamento com extrato de folhas infiltradas com rBPSP-I por meio dos subprodutos da banda α do fibrinogênio, algo que não foi observado nos tratamentos com o material selvagem, conforme pode ser visto na Figura 14.

Figura 14: Atividade Fibrinogenolítica da rBPSP-I. A: Atividade fibrinogenolítica por 5 minutos de incubação do controle negativo. B: Atividade fibrinogenolítica por 10 minutos de incubação do controle negativo. C: Atividade fibrinogenolítica por 30 minutos de incubação do controle negativo. D: Atividade fibrinogenolítica por 60 minutos de incubação do controle negativo. E: Atividade fibrinogenolítica por 120 minutos de incubação do

controle negativo. F: Fibrinogênio controle. G: Atividade fibrinogenolítica por 5 minutos de incubação da rBPSP-I. H: Atividade fibrinogenolítica por 10 minutos de incubação da rBPSP-I.

I. I: Atividade fibrinogenolítica por 30 minutos de incubação da rBPSP-I. J: Atividade fibrinogenolítica por 60 minutos de incubação da rBPSP-I. K: Atividade fibrinogenolítica por 120 minutos de incubação da rBPSP-I. MM: Padrão de Massa Molecular em kDa.



6 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, pode-se afirmar que foi possível realizar a transformação das bactérias e *R. radiobacter* com o gene codificante da serinoprotease *thrombin-like* derivada da peçonha de *B. pauloensis* (rBPSP-I) possibilitando a posterior agroinfiltração. Houve a confirmação da expressão de uma proteína detectada no western-blot apenas no material extraído das folhas transformadas com a construção rBPSP-I e ausente no material controle. No entanto, a massa molecular observada é divergente da esperada teórica para a proteína estudada necessitando assim de experimentos futuros para a confirmação da identidade desta.

Foi possível realizar o estudo de funcionalidade parcial através da análise da atividade fibrinogênolítica da rBPSP-I, presente nos extratos proteicos infiltrados e ausente no material controle.

Como experimentos futuros, torna-se necessária a confirmação da identidade da proteína expressa bem como, a realização de novos ensaios funcionais de sua atividade.

7 REFERÊNCIAS

Agrobacterium tumefaciens – Plant Parasites of Europe. Disponível em: <<https://bladmeeesters.nl/parasites/bacteria/proteobacteria/rhizobiales/agrobacterium/agrobacterium-tumefaciens/>>. Acesso em: 1 set. 2020.

ALAPE-GIRÓN, A. et al. Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 8, p. 3556–3571, ago. 2008.

BARBO, F. E. et al. Another new and threatened species of lancehead genus *Bothrops* (Serpentes, Viperidae) from Ilha dos Franceses, Southeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 4097, n. 4, p. 511–529, 4 abr. 2016.

BERNARDE, P. S. Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. p. 9, 3 jan. 2011.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 07–16, fev. 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, n. 9, p. 851–859, 10 set. 2000.

BRETTTHAUER, R. K.; CASTELLINO, F. J. Glycosylation of *Pichia pastoris* -derived proteins. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 30, n. 3, p. 193–200, 1999.

CAIO, V. M. et al. Genética comunitária e hemofilia em uma população brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 3, p. 595–605, jun. 2001.

CASEWELL, N. R. et al. Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 25, p. 9205–9210, 24 jun. 2014.

CHEN, M.-H. et al. Signal Peptide-Dependent Targeting of a Rice α -Amylase and Cargo Proteins to Plastids and Extracellular Compartments of Plant Cells. **Plant Physiology**, v. 135, n. 3, p. 1367–1377, 1 jul. 2004.

CIRCELLI, P. et al. Efficient *Agrobacterium*-based transient expression system for the production of biopharmaceuticals in plants. **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 3, p. 221–224, 1 maio 2010.

CUNHA, E. M. DA; MARTINS, O. A. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*—uma revisão. *Revista Eletrônica de educação e ciência*, v. 2, n. 2, , 2012. v. 2, n. 2, p. 21–26, 2012.

DANIELL, H. et al. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 12, p. 669–679, 1 dez. 2009.

DARGAUD, Y. et al. Use of thrombin generation assay to personalize treatment of breakthrough bleeds in a patient with hemophilia and inhibitors receiving prophylaxis with emicizumab. **Haematologica**, v. 103, n. 4, p. e181–e183, 1 abr. 2018.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297–306, 1 maio 2009.

DI CERA, E. Serine Proteases. **IUBMB life**, v. 61, n. 5, p. 510–515, maio 2009.

DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 17, p. 2851–2871, 1 set. 2009.

DOS SANTOS, I. G. C.; FORTES-DIAS, C. L.; DOS SANTOS, M. C. Aplicações farmacológicas dos venenos de serpentes brasileiras enfoque para *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus ruruima* L. [s.d.].

FENKER, J. et al. Phylogenetic diversity, habitat loss and conservation in South American pitvipers (Crotalinae: *Bothrops* and *Bothrocophias*). **Diversity and Distributions**, v. 20, n. 10, p. 1108–1119, 2014.

FERREIRA, M. L. et al. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. **Toxicon**, v. 30, n. 12, p. 1603–1608, dez. 1992.

FISCHER, R. et al. Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. p. 4, 1999.

GECHELE, E. et al. A Comparative Analysis of Recombinant Protein Expression in Different Biofactories: Bacteria, Insect Cells and Plant Systems. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 97, p. e52459, 23 mar. 2015.

GELVIN, S. B. ***Agrobacterium* Biology: From Basic Science to Biotechnology**. [s.l.] Springer, 2018.

GUO, M. et al. *Agrobacterium*-mediated horizontal gene transfer: Mechanism, biotechnological application, potential risk and forestalling strategy. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 1, p. 259–270, 1 jan. 2019.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 976–987, dez. 2009.

HAMILTON, S. R.; GERNGROSS, T. U. Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. **Current Opinion in Biotechnology**, Expression technologies / Tissue and cell engineering. v. 18, n. 5, p. 387–392, 1 out. 2007.

HEDSTROM, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501–4524, dez. 2002.

Herpetologia Brasileira. v. 8, p. 64, 2018.

ISABEL, T. F. et al. Expression and partial biochemical characterization of a recombinant serine protease from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 115, p. 49–54, 1 jun. 2016.

JABLAOUI, A. et al. Biotechnological Applications of Serine Proteases: A Patent Review. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 280–287, 2018.

KOMAROVA, T. V. et al. Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. **Expert Review of Vaccines**, v. 9, n. 8, p. 859–876, 1 ago. 2010.

LEUZINGER, K. et al. Efficient Agroinfiltration of Plants for High-level Transient Expression of Recombinant Proteins. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 77, 23 jul. 2013.

M. RODRIGUES, V. et al. ***Bothrops pauloensis* Snake Venom Toxins: The Search for New Therapeutic Models**. Text. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/ctmc/2015/00000015/00000007/art00011>>. Acesso em: 4 abr. 2019.

MA, J. K.-C.; DRAKE, P. M. W.; CHRISTOU, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 10, p. 794–805, out. 2003.

MACHADO, A. S. et al. Acidente vascular cerebral hemorrágico associado à acidente ofídico por serpente do gênero *bothrops*: relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 602–604, out. 2010.

MACHADO, T.; SILVA, V. X.; SILVA, M. J. DE J. Phylogenetic relationships within *Bothrops neuwiedi* group (Serpentes, Squamata): Geographically highly-structured lineages, evidence of introgressive hybridization and Neogene/Quaternary diversification. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 71, p. 1–14, fev. 2014.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: Classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 7–8, p. 1220–1236, abr. 2008.

PEYRET, H.; LOMONOSSOFF, G. P. The pEAQ vector series: the easy and quick way to produce recombinant proteins in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 83, n. 1, p. 51–58, 1 set. 2013.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 24–29, mar. 2001.

QUEIROZ, G. P. et al. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 842–851, dez. 2008.

RODRIGUES, R. S. et al. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 9, p. 2707–2720, 17 maio 2012.

SAINSBURY, F.; THUENEMANN, E. C.; LOMONOSSOFF, G. P. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 7, n. 7, p. 682–693, 1 set. 2009.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 627–645, 1 abr. 2011.

SERRANO, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**, Milestones and future prospects in snake venom research. v. 62, p. 19–26, 1 fev. 2013.

SOUCIE, J. M.; EVATT, B.; JACKSON, D. Occurrence of hemophilia in the United States. **American Journal of Hematology**, v. 59, n. 4, p. 288–294, 1998.

SRIVASTAVA, A. et al. Guidelines for the management of hemophilia. **Haemophilia**, v. 19, n. 1, p. e1–e47, 2013.

The Genome of *Agrobacterium tumefaciens*. Disponível em: <http://www.genomenetwork.org/articles/12_01/A_tumefaciens_genome.shtml>. Acesso em: 1 set. 2020.

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**, v. 22, n. 1, p. 128–132, 2013.

ULLAH, A. et al. Thrombin-like enzymes from snake venom: Structural characterization and mechanism of action. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 788–811, 15 jul. 2018.

VARDAKOU, M. et al. Expression of active recombinant human gastric lipase in *Nicotiana benthamiana* using the CPMV-HT transient expression system. **Protein Expression and Purification**, v. 81, n. 1, p. 69–74, 1 jan. 2012.

WAHEED, H.; MOIN, S. F.; CHOUDHARY, M. I. Snake Venom: From Deadly Toxins to Life-saving Therapeutics. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 17, p. 1874–1891, 2017.

WALSH, G. **Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2013.

YOUNG, C. L.; BRITTON, Z. T.; ROBINSON, A. S. Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 5, p. 620–634, 1 maio 2012.