

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Clonagem do gene codificante do anticorpo recombinante scFv-SVMP

Leticia Regina Lonardoni

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 BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Clonagem do gene codificante do anticorpo recombinante scFv-SVMP

Leticia Regina Lonardoni

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 BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Clonagem do gene codificante do anticorpo recombinante scFv-SVMP

Leticia Regina Lonardoni

Prof. Dr. Rafael Nascimento

Instituto de Biotecnologia

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

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG

Dezembro - 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Clonagem do gene codificante do anticorpo recombinante scFv-SVMP

Leticia Regina Lonardoni

Aprovado pela Banca Examinadora em: ____ / ____ / ____

Nota: ____

Prof. Dr. Rafael Nascimento

Uberlândia, _____ de _____ de _____ .

Dedico a minha mãe, Sandra.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Rafael Nascimento por ter me concedido a oportunidade de aprender tudo o que aprendi enquanto realizava esse projeto e por aceitar me orientar no mesmo.

À Dra. Hebréia por sempre estar disposta a me ajudar e a sanar todas as minhas dúvidas sempre que precisei. E também por todo conhecimento e crescimento, tanto científico quanto pessoal que recebi.

À Jessica, que por meses viveu esse projeto comigo, sempre me ajudando, ensinando e correndo contra o tempo para que ele fosse concluído. Sem a sua ajuda, a trajetória de experimentos teria sido mais difícil.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo por disponibilizar o laboratório de Nanobiotecnologia para a realização dos experimentos, e aos integrantes do laboratório, principalmente à Aline, que mesmo longe, me auxiliou e tornou possível as minhas PCRs, e à Emília pelos ensinamentos e ajuda que me concedeu em diversos experimentos.

Agradeço a minha mãe Sandra, por sempre me apoiar e incentivar em todas as minhas escolhas, e por todo o esforço e paciência que sempre teve comigo. Sem você essa jornada seria impossível, amo você.

Aos meus irmãos Giovanna, Rafael e Rodrigo por sempre me apoiarem e torcerem por mim.

À Natália, que por todos esses anos me acompanhou na graduação e principalmente nesta fase tão importante. Obrigada por tudo, sem você essa trajetória teria sido muito mais difícil.

Aos meus amigos de laboratório e de graduação José Augusto e Natieli, por sempre estarem na torcida dos meus resultados, por toda a ajuda e por todos os momentos de alegria que passamos.

E a todos que me acompanharam nessa trajetória, especialmente Thaynara, Maristela, Vitor e Artur, por me proporcionarem tanta alegria ao longo desses anos.

RESUMO

No Brasil, cerca de 90% dos acidentes ofídicos são causados por serpentes do gênero *Bothrops* e a única forma de tratamento é a administração de antivenenos que causam diversos efeitos colaterais, hipersensibilidade, choque anafilático e doença grave do soro. Estudos com fragmentos de scFv mostram sua efetividade em inativar seus alvos rapidamente reduzindo danos causados pela peçonha de serpentes. O scFv-SVMP é um fragmento variável de cadeia única capaz de inibir as ações hemorrágica e fibrinogenolítica da peçonha bruta e de uma metaloprotease isolada da peçonha bruta de *B. pauloensis*. O objetivo deste trabalho foi realizar a clonagem do gene codificante do anticorpo recombinante scFv-SVMP e a transformação de células de *Rhizobium radiobacter*. O estudo resultou na clonagem eficaz do gene de interesse e a sua inserção em células de *R. radiobacter* possibilitando uma alternativa ao método de produção atual de antiveneno.

Palavras-chave: Acidentes ofídicos; scFv; clonagem.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Acidentes ofídicos e soros antivenenos.....	1
1.2. scFv e seu potencial como antiveneno	3
1.3. Seleção do scFv-SVMP	4
1.4. Clonagem de um gene de interesse	5
2. OBJETIVOS	8
2.1. Objetivo geral:	8
2.2. Objetivos específicos:.....	9
3. METODOLOGIA.....	9
3.1. Cultura de <i>E.coli DH5α</i>	9
3.2. Extração de DNA genômico de <i>E.coli DH5α</i>	9
3.3. Quantificação da concentração de DNA	10
3.4. Desenho de <i>primers</i> para clonagem do gene scFv-SVMP.....	10
3.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	10
3.6. Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose	11
3.7. Purificação do produto do gel de agarose	11
3.8. Cultura de <i>E.coli DH10B</i> e extração de DNA plasmidial de vetor comercial pEAQ-HT ..	12
3.9. Digestão do produto de PCR e plasmídeo com enzimas de restrição	13
3.10. Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose.....	13
3.11. Ligação dos fragmentos pela T4 DNA ligase	13
3.12. Transforma�o de células de eletrocompetentes <i>E.coli DH5α</i>	14
3.13. Confirma�o da liga�o através de PCR	14
3.14. Transforma�o de <i>Rhizobium radiobacter</i> eletrocompetentes	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1. Confirma�o e amplifica�o do gene scFv-SVMP por PCR a partir do seu DNA genômico.....	16
4.2. Digestão do gene scFv-SVMP e do vetor pEAQ-HT com as enzimas de restri�o NruI e XhoI.....	19
4.3. Confirma�o da inser�o do gene codificante do anticorpo scFv-SVMP no vetor pEAQ-HT	20
4.4. Transforma�o de células eletrocompetentes	22
5. CONCLUSÃO.....	23
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

LISTA DE ABREVIATURAS

$^{\circ}\text{C}$ - Graus Celsius

DNA - Ácido desoxirribonucleico

g - Grama

h - Hora

LB - Luria Bertani

M - Molar

mg - Miligrama

MgCl_2 - Cloreto de Magnésio

min - Minuto

mL - Mililitro

mM - Milimolar

NaCl - Cloreto de Sódio

ng - Nanograma

nm - Nanômetro

pb - Par de bases

rpm - Rotações por minuto

scFv - Fragmento de anticorpo de cadeia única

SVMP - Snake Venom Metalloproteinase

μg - Micrograma

μL - Microlitro

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidentes ofídicos e soros antivenenos

Os acidentes ofídicos representam um problema de saúde pública, considerando sua alta incidência e a gravidade de seus efeitos, uma vez que afeta principalmente a população rural em países subdesenvolvidos de áreas tropicais como Ásia, África e América Latina, este é um problema extremamente negligenciado (SACHETT et al., 2017).

O envenenamento por picadas de cobras venenosas é um problema médico frequentemente discutido em todo o mundo devido a sobreposição frequente de habitats humanos com habitats de serpentes (SAJEVIC et al., 2011). O envenenamento por serpentes mata mais pessoas nos trópicos do que algumas das doenças tropicais negligenciadas reconhecidas no mundo (KASTURIRATNE et al., 2008).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), são estimados que ocorrem entre 1,8 e 2,7 milhões de casos de envenenamento por serpentes, e dentre estes, 81.000 a 138.000 resultam em morte (LAUSTSEN et al., 2018). Na América do Sul, os principais episódios de acidentes ofídicos são causados por cobras do gênero *Bothrops*, sendo este grupo de espécies com alta importância médica (GOIS et al., 2017). As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos que ocorrem no Brasil, os quais são caracterizados por lesões locais, incluindo hemorragia, micronecrose, dermonecrose, edema, e alterações sistêmicas, com coagulopatia característica da maioria dos acidentes (FRANÇA e MÁLAQUE, 2009).

As serpentes do gênero *Bothrops* estão distribuídas em todo o território brasileiro sendo representadas por 42 diferentes espécies, como por exemplo, a *Bothrops pauloensis* (CARRASCO et al., 2012).

Pode-se destacar como os componentes mais abundantes do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*: proteases, como metaloproteinases e serinoproteinases, fosfolipases A2, L-aminoácido oxidase, 5'-nucleotidase, hialuronidase e lectinas tipo C (ALAM et al., 1996; KINI, 2006; SOUSA et al., 2013).

As metaloproteinases são enzimas que atuam tanto nos efeitos locais, quanto sistêmicos. Elas agem em uma variedade de substratos, incluindo proteínas plasmáticas, componentes da via de coagulação, componentes da matriz extracelular localizados na membrana basal da microvasculatura, células endoteliais e componentes envolvidos na agregação plaquetária. Além disso, ativam células inflamatórias, que liberam mediadores como citocinas e estimulam a migração de células para o local da picada (MOURA-DA-SILVA et al., 2009).

As SVMPs (*Snake Venom Metalloproteinases*) pertencem à superfamília das metzincinas, subfamília das reprotinas, que são peptidases dependentes de zinco e estão relacionadas evolutivamente às metaloproteinases que degradam matriz extracelular e às proteínas ADAMs (*A Disintegrin and Metalloproteinase*) (BODE et al., 1993; STOCKER e BODE, 1995).

O tratamento mais efetivo para o envenenamento por picada de cobra é a soroterapia. No entanto, os antivenenos ainda são feitos usando um método que não mudou há mais de um século. Animais, tipicamente cavalos e ovelhas, são imunizados com pequenas quantidades de proteínas purificadas extraídas do veneno de cobra, o que estimula a produção de anticorpos. Estes anticorpos, purificados do plasma animal, são então administrados a pacientes acometidos por picada de cobra. Este plasma é responsável pelos efeitos adversos, por vezes, observados na terapia convencional, incluindo vários tipos de hipersensibilidade, choque anafilático e doença grave do soro. Por isso, este tratamento apresenta limitações importantes. Além disso, cada tipo de antiveneno é eficaz contra apenas uma única espécie ou, no máximo, um pequeno grupo de espécies. Existem restrições na eficácia dos antivenenos para neutralizar alguns efeitos

particulares dos envenenamentos, e esses antivenenos não são eficazes na prevenção de danos teciduais locais induzidos por veneno, o que frequentemente leva à incapacidade permanente (GUTIERREZ et al., 2016).

Essas limitações motivam a busca de agentes neutralizantes alternativos a partir de uma variedade de fontes. Além do mais, o número de empresas farmacêuticas que produzem antivenenos está diminuindo, o que resulta na grave escassez de antivenenos que se enfrenta no momento (ARNOLD, 2016).

Na tentativa de superar algumas dessas questões, desenvolveu-se um anticorpo de fragmento variável de cadeia única (scFv) contra a peçonha de um importante serpente brasileira conhecida como Jararaca pintada (*Bothrops pauloensis*).

1.2. scFv e seu potencial como antiveneno

O fragmento de anticorpo de cadeia única (scFv) é constituído por uma região variável da cadeia pesada (VH) de imunoglobulina e uma outra região variável da cadeia leve (VL) da imunoglobulina. Uma de suas vantagens é a produção simples no hospedeiro bacteriano (HUSTON et al., 1988). Fragmentos de anticorpo como scFv e Fab (fragmento ligante de antígeno), foram usados para neutralizar componentes tóxicos de diversos venenos, incluindo toxinas de escorpiões (SELISKO et al. 2003), *Latrodectus mactans* (viúva negra) (BUGLI et al. 2008) e de serpente (TAMAROZZI et al., 2006), mostrando o potencial do uso de bibliotecas scFv recombinantes como importante fonte de anticorpos monoclonais que podem ser utilizadas para neutralizar relevantes componentes de veneno.

Sendo assim, uma alternativa ao tratamento convencional dos acidentes ofídicos é o uso de anticorpos monoclonais recombinantes. O anticorpo scFv é uma importante forma de anticorpo recombinante para tratamento de envenenamento (LAUSTEN et al 2016).Tais

moléculas apresentam várias características distintas quando comparadas a outros anticorpos, como maior difusão nos tecidos afetados, baixa imunogenicidade, eliminação mais rápida e menor formação de imunocomplexos (AZZAZY e HIGHSMITH, 2002; ZHANG et al., 2014; YU et al., 2014).

Sendo baseado em uma proteína recombinante altamente pura, e produzido em um hospedeiro controlado, o antiveneno baseado em scFv desprovido de proteínas animais contaminantes representa uma melhoria substancial em relação a outros produtos derivados de soros de animais. Além disso, os fragmentos scFv retêm a capacidade de se ligar e inativar seus alvos, mas são menores e apresentam um maior volume de distribuição corporal do que os anticorpos IgG, sugerindo que eles podem ter uma penetração tecidual mais rápida e difusa. Isso pode resultar na rápida inativação das moléculas de toxina circulantes e na resolução mais precoce dos sintomas, reduzindo os danos musculares locais e a morte do tecido (CHAMES et al., 2009).

Uma das formas mais econômicas de produzir grandes quantidades e anticorpos livres de contaminantes é por sua expressão heteróloga em plantas (STOGER et al., 2002).

1.3. Seleção do scFv-SVMP

A metodologia do *phage display* foi descrita pela primeira vez por George Smith em 1985. Smith expressou a enzima de restrição Eco RI ligada a proteína três (pIII) de um fago filamentoso (bacteriófago). A metodologia denominada Phage display tem por base a expressão de peptídeos ou proteínas no exterior da partícula viral, enquanto o material genético codificante permanece no genoma viral (AZZAZY & HIGHSMITH, 2002).

Os primeiros fragmentos de anticorpos foram expressos em fagos em 1990 (MCCAFFERTY et al. 1990). Bibliotecas de anticorpos são sintetizadas através da construção de genes de

fragmentos de anticorpos recombinantes na forma scFv ou Fab. Através da manipulação genética, esses genes são inseridos em plasmídeos fusionados ao gene codificador de uma proteína capsídica (CARDOSO, 2008).

Cardoso et al. realizou um estudo no qual foi construída uma biblioteca scFv de galinhas imunizadas com peçonha bruta de *B. pauloensis*. A partir desta biblioteca, foi selecionado um anticorpo específico a toxinas presentes na peçonha bruta, o qual apresentou efeito neutralizante a ação hemorrágica da peçonha, assim como a atividade fibrinogenolítica de uma mealoprotease não hemorrágica presente nesta peçonha (Neuwiedase). (CARDOSO, 2008).

1.4. Clonagem de um gene de interesse

A habilidade de construir moléculas de DNA recombinantes e introduzi-las em um organismo hospedeiro é chamada de clonagem de DNA (WATSON et al, 2015).

Uma estratégia básica na clonagem molecular é a inserção de um fragmento de DNA de interesse (por exemplo, um segmento de DNA humano) em uma molécula de DNA circular (plasmídeo) que seja capaz de replicação independente em uma célula hospedeira. Isto resulta em uma molécula recombinante ou clone molecular, composta pela inserção de DNA ligada às sequências de DNA do vetor (Figura 1) (COOPER & HAUSMAN, 2007).

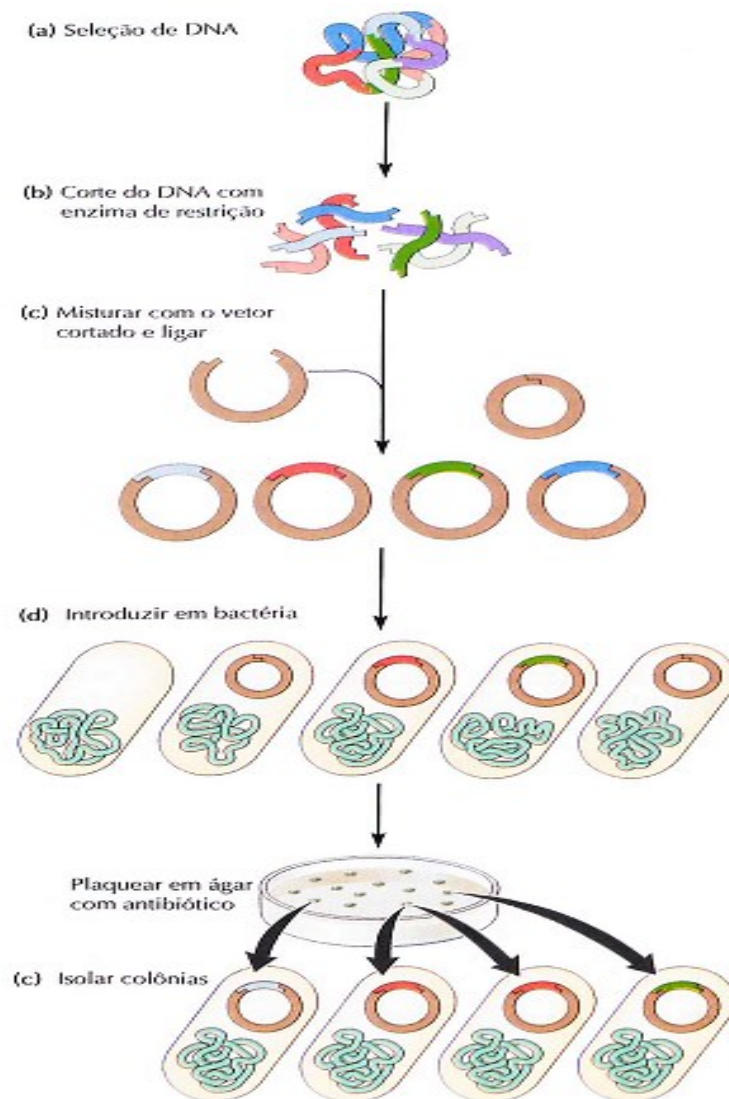


Figura 1. As cinco etapas de clonagem de DNA em um plasmídeo. (a) O DNA contendo o gene de interesse é preparado. (b) O DNA é tratado com uma enzima de restrição para cortar o DNA em fragmentos de um tamanho adequado para inserção em um vetor cortado com a mesma enzima de restrição. (c) Os fragmentos de DNA são misturados com moléculas do vetor e a DNA ligase é utilizada para ligá-los covalentemente. (d) As moléculas recombinantes são introduzidas nas bactérias, que são plaqueadas em ágar contendo um antibiótico de seleção. Isto mata qualquer bactéria que não carregue o plasmídeo (que contém um gene de resistência ao antibiótico). (e) Os clones contendo o gene de interesse são selecionados (WATSON, 2009).

Os fragmentos de DNA usados para criar moléculas recombinantes são geralmente gerados por digestão com enzimas de restrição. Essas enzimas clivam suas sequências de reconhecimento em locais específicos. A associação entre essas extremidades complementares

emparelhadas pode ser estabelecida permanentemente por tratamento com DNA ligase, uma enzima que sela as quebras nas cadeias de DNA. Assim, dois fragmentos diferentes de DNA (por exemplo, uma inserção de DNA humano e um vetor de DNA plasmídeo) preparados por digestão com a mesma enzima de restrição podem ser facilmente unidos para criar uma molécula de DNA recombinante (COOPER & HAUSMAN, 2007).

A amplificação é feita através de processos genéticos procarióticos, incluindo os de transformação bacteriana e replicação de plasmídeos. Um vetor recombinante entra em uma célula bacteriana e é amplificado pela replicação que ocorre na divisão celular. No processo, várias cópias de vetor são inseridas em cada bactéria, sendo assim, após a amplificação, uma colônia de bactérias tipicamente conterá bilhões de cópias do inserto do DNA doador fundido ao seu cromossomo. Esse conjunto de cópias amplificadas do fragmento de DNA dentro do vetor de clonagem é o clone de DNA recombinante. Um requisito básico é a presença de uma origem de replicação de DNA (GRIFFITHS et al., 2008), a qual consiste em uma sequência de DNA que sinaliza a DNA polimerase da célula hospedeira para replicar a molécula de DNA. Além disso, os vetores de plasmídeo carregam genes que conferem resistência aos antibióticos, portanto, as bactérias transformadas são plaqueadas em ágar contendo antibiótico (por exemplo, ampicilina). Somente crescerão aquelas bactérias contendo os plasmídeos, pois estas conferem resistência ao antibiótico, de modo que as bactérias que transportam os plasmídeos podem ser selecionadas (COOPER & HAUSMAN, 2007; WATSON, 2009).

O vetor plasmídial de expressão utilizado neste estudo para a realização da clonagem do gene codificante do anticorpo recombinante scFv-SVMP é apresentado na figura 2.

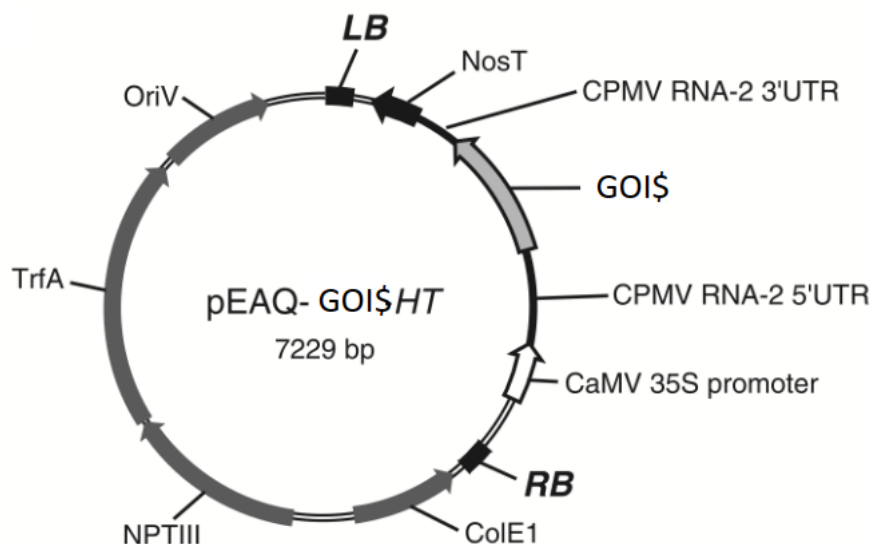


Figura 2: Representação esquemática do vetor pEAQ-HT. Onde RB é a borda direita e LB a borda esquerda; Promotor 35S CaMV (*Cauliflower Mosaic Virus*); GOI, o gene de interesse; NosT, sequências terminadoras: *Nopaline synthase*; OriV, a origem de replicação; NPT, o gene de resistência ao antibiótico Canamicina: *Neomycin Phospho-transferase*.

Sabendo-se da importância dos antivenenos para o tratamento dos acidentes ofídicos e diante das várias desvantagens que os atuais apresentam, tanto em aspectos de produção quanto de efeitos colaterais que os pacientes estão propícios a apresentar, a procura de uma alternativa ao tratamento atual dos acidentes ofídicos é necessária. Para isso, a clonagem do gene codificante do anticorpo recombinante scFv-SVMP é o início do processo para a obtenção de um produto alternativo ao atual, o qual trará melhorias significativas ao tratamento praticado atualmente.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Clonagem do gene codificante do anticorpo recombinante scFv-SVMP e transformação de *Rhizobium radiobacter* eletrocompetentes.

2.2. Objetivos específicos:

- Amplificação do gene codificante do anticorpo recombinante scFv-SVMP;
- Tratamento do DNA amplificado e do vetor de expressão pEAQ-HT com enzimas de restrição;
- Inserção do DNA do anticorpo scFv-SVMP no vetor de expressão pEAQ-HT;
- Transformação de *R. radiobacter* eletrocompetentes.

3. METODOLOGIA

3.1. Cultura de *E.coli DH5α*

Os estoques de *E.coli DH5α* contendo o gene codificante do anticorpo scFv-SVMP em glicerol 50% foram recuperados em placas de Petri com meio LB (1% de tripton; 0,5% de extrato de levedura; 1% de NaCl) sólido, contendo Gentamicina 10 µg/µL à 37 °C por 24 horas. Foram selecionadas destas placas colônias para o crescimento em meio LB líquido a 37 °C sob agitação de 180 rpm, por 24 h. Foi adicionado 10 µg de Gentamicina 10 µg/µL para cada 1 mL de meio LB, para que houvesse a seleção das bactérias com o gene de interesse.

3.2. Extração de DNA genômico de *E.coli DH5α*

A extração do DNA genômico da *E.coli DH5α* foi feita com o QIAprep® Spin Miniprep Kit (*Qiagen*). Foi peletizado 4 mL da cultura crescida *overnight* por centrifugação em microtubo de 2 mL a 8.000 rpm por 3 minutos. As células bacterianas foram ressuspensas em 250 µL de *Buffer* P1. Adicionou-se 250 µL de *Buffer* P2 e o microtubo foi invertido 6 vezes para a mistura dos reagentes, em seguida, foi adicionado 350 µL de *Buffer* N3 e inverteu-se o tubo novamente por 6 vezes. Centrifugou-se a amostra por 10 minutos a 13.000 rpm. O

sobrenadante foi aplicado na coluna QIAprep spin column. Foram centrifugados a 13.000 rpm por 1 minuto e o líquido resultante foi descartado. Adicionou-se 750 µL de Buffer PE e em seguida centrifugou-se a amostra por 1 minuto a 13.000 rpm. Descartou-se o líquido resultante e centrifugou-se mais duas vezes, por 1 minuto cada centrifugação, para a retirada de resíduos de etanol da solução e os resíduos foram descartados. Posicionou-se a coluna em um microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 50 µL do tampão de *Buffer* EB. Deixou-se o líquido em contato com a membrana da coluna durante 1 minuto e centrifugou-se a 13.000 rpm por 1 minuto.

3.3. Quantificação da concentração de DNA

As quantificações do DNA extraído das *E.coli* DH5α foram feitas com o NanoDrop™ 1000 (*Thermo Scientific*) utilizando 2 µL de cada amostra. O grau de pureza das amostras foi analisado considerando as razões A260nm/A280nm e A260nm/A230nm. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -20 °C.

3.4. Desenho de *primers* para clonagem do gene scFv-SVMP

Os *primers* foram desenhados utilizando a ferramenta PrimerQuest disponível no Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/pages>).

3.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a amplificação do gene codificante do anticorpo scFv-SVMP foram utilizadas as seguintes condições para o preparo das amostras: 10 µL de Mix para PCR (GoTaq® Green

Master Mix, que é composto por Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂ e tampões de reação em concentrações ótimas para amplificação eficiente de modelos de DNA por PCR.); 1 µL de primer Forward; 1 µL de primer Reverse; 1 µL de DNA (200 ng) e 7 µL de água de injeção. As amostras foram colocadas no termociclador, que foi ajustado para iniciar com uma desnaturação a 95 °C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 50 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minutos. Após os 35 ciclos finalizou-se com uma extensão a 72 °C por mais 1 minuto. Após o término da reação, o produto de PCR foi mantido a -4 °C.

3.6. Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose

O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, preparado com tampão TBE 0,5X (Solução estoque 5X: 0,4 M de Tris-base; 0,4 M de Ácido Bórico; 60 mM de EDTA 0,5M pH 8,0). As amostras foram preparadas com 10 µL de produto de PCR e 2 µL de Gel Red 1:500. Durante as corridas eletroforéticas, os géis foram imersos em TBE 0,5X e a voltagem utilizada foi de 100 volts. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram inferidos por comparação com a migração dos fragmentos do Marcador de Peso Molecular Ladder 100 pb (*Ludwig Biotec*).

3.7. Purificação do produto do gel de agarose

As bandas contendo os DNAs das amostras foram cortadas do gel com o auxílio de um bisturi, e colocadas em microtubos de 2 mL. Para a purificação do DNA contido no gel de agarose, foi utilizado o MinElute® Gel Extraction Kit (*Qiagen*). Os tubos contendo o fragmento de gel foram pesados e foi adicionado 3 volumes de Buffer QG para cada volume de gel,

adotando-se que 100 mg de gel são equivalentes a 100 μ L. Incubou-se os microtubos a 50°C por 10 minutos sob agitação a cada 2 minutos. Após a dissolução completa do gel, foi adicionado 1 volume do gel de isopropanol, e misturou-se por inversão. Cada amostra foi inserida em uma coluna (MiniElute spin column) e centrifugou-se a 13.000 rpm por 1 minuto e descartou-se o líquido residual do tubo coletor. Após a centrifugação de toda a amostra e descarte dos líquidos resultantes, foram adicionados 500 μ L de Buffer QG na coluna e centrifugou-se a 13.000 rpm por 1 minuto. O líquido resultante foi descartado e adicionou-se 750 μ L de Buffer PE na coluna e centrifugou-se por 1 min a 13.000 rpm. O líquido resultante foi descartado e a coluna foi centrifugada mais duas vezes a fim de evitar resíduos de etanol provenientes da solução. Descartou-se o líquido residual e a coluna foi posicionada em um microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se 10 μ L de Buffer EB no centro da membrana da coluna e esperou-se 1 minuto para a eluição completa do DNA. Centrifugou-se a amostra por 1 minuto a 13.000 rpm. A coluna foi descartada e o DNA quantificado pelo NanoDropTM 1000 (*Thermo Scientific*) e armazenado a -20 °C.

3.8. Cultura de E.coli DH10B e extração de DNA plasmidial de vetor comercial pEAQ-HT

A partir dos estoques de E.coli DH10B contendo o plasmídeo pEAQ-HT em glicerol 50%, fez-se um inóculo em meio LB contendo proporcionalmente 1 μ L de Canamicina 50 μ g/ μ L para cada 1 mL de meio LB a 37 °C, sob agitação de 180 rpm por 24h. O inóculo foi utilizado para a mini-preparação de DNA plasmidial a partir do QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (*Qiagen*) e em seguida foi quantificado pelo NanoDropTM 1000 (*Thermo Scientific*), conforme descrito, e armazenado a -20°C.

3.9. Digestão do produto de PCR e plasmídeo com enzimas de restrição

Fez-se a digestão do produto de PCR do gene codificante do scFv-SVMP e do DNA do plasmídeo pEAQ-HT separadamente, sob as seguintes condições: 1 µg de DNA; 5 µL de tampão 3.1; 1 µL da enzima de restrição Xho I; 1 µL da enzima de restrição Nru I e completou-se com água de injeção até que se obtivesse o volume final de 50 µL. Após o preparo, as amostras foram incubadas à 37 °C por 60 minutos para a ativação das enzimas de restrição e à 80 °C por 20 minutos para a inativação das enzimas de restrição. Os produtos das digestões foram analisados por eletroforese de gel de agarose, no qual foi aplicado toda a digestão no gel. Posteriormente o gel foi analisado sob luz ultravioleta, tendo como referência os tamanhos dos fragmentos do Marcador de Peso Molecular Ladder 100 pb (*Ludwig Biotec*).

3.10. Purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose

Os fragmentos de DNA digeridos foram purificados do gel de agarose pelo MinElute® Gel Extraction Kit (*Qiagen*), como já descrito, e o DNA quantificado pelo NanoDrop™ 1000 (*Thermo Scientific*) e armazenado a 4 °C.

3.11. Ligação dos fragmentos pela T4 DNA ligase

A ligação entre os fragmentos de DNA do scFv-SVMP e do DNA do vetor pEAQ-HT foi realizada seguindo as recomendações do fabricante da enzima T4 DNA Ligase (*Biolabs*), utilizando a proporção 5:1 (inserto:vetor), sob as seguintes condições: 2 µL de Buffer 10X, 2 µL de vetor (100 ng), 2 µL de inserto (44,1 ng), 1,5 µL da enzima T4 DNA Ligase e 14,5 µL

de água de injeção. A reação foi incubada a 16 °C por 24 h, e para a inativação da enzima elevou-se a temperatura da amostra a 65 °C por 10 min.

3.12. Transformação de células de eletrocompetentes *E.coli* DH5 α

Adicionou-se 3 μ L do produto da ligação em um microtubo contendo 50 μ L de células *E.coli* DH5 α eletrocompetentes, previamente preparadas. A amostra foi transferida para uma cubeta de eletroporação que foi submetida a um pulso de 1,8 kV (eletroporador Gene Pulse, BioRad). Em seguida, as células foram ressuspensas com 1 mL de meio LB e transferidas para um tubo falcon que permaneceu a 37 °C por 30 min a uma agitação de 180 rpm, para que houvesse a recuperação das células. Posteriormente, as células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo Canamicina 50 μ g/ μ L, para que houvesse a seleção das células transformadas. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h.

3.13. Confirmação da ligação através de PCR

Para a confirmação da ligação, três colônias de bactérias foram selecionadas da placa e incubadas em três diferentes tubos falcons (um para cada colônia), contendo meio LB líquido e Canamicina a 37 °C por 12 h. Posteriormente, foi realizado a extração do DNA genômico das bactérias de cada colônia, utilizando o QIAprep® Spin Miniprep Kit (*Qiagen*), como descrito anteriormente. O DNA extraído foi quantificado pelo NanoDrop™ 1000 (*Thermo Scientific*) e em seguida preparou-se a reação de PCR da seguinte maneira: 200 ng de DNA genômico; 10 μ L de Mix para PCR (GoTaq® Green Master Mix); 1 μ L de primer Forward; 1 μ L de primer Reverse e completou-se com água de injeção até se obter o volume final de 20 μ L. Em seguida, as amostras foram colocadas no termociclador ajustado para iniciar com uma desnaturação a 95

°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Após os 35 ciclos finalizou-se com uma extensão a 72 °C por mais 1 minuto. Após o término da reação, o produto de PCR foi mantido a -4 °C. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, preparado com tampão TBE 0,5X. As amostras foram preparadas com 10 µL de produto de PCR e 2 µL de Gel Red 1:500. Durante a corrida eletroforética, o gel foi imerso em TBE 0,5X e a voltagem utilizada foi de 100 volts. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram inferidos por comparação com a migração dos fragmentos do Marcador de Peso Molecular Ladder 100 pb (*Ludwig Biotec*).

3.14. Transformação de *Rhizobium radiobacter* eletrocompetentes

Após a confirmação da inserção do fragmento de DNA que codifica o anticorpo recombinante scFv-SVMP no vetor pEAQ-HT, foi realizada a transformação de *R. radiobacter* eletrocompetentes. Adicionou-se 3 µL do produto da reação de ligação em um microtubo contendo 50 µL de células *R. radiobacter* eletrocompetentes, previamente preparadas. A amostra foi transferida para uma cubeta de eletroporação que foi submetida a um pulso de 1,8 kV (eletroporador Gene Pulse, BioRad). Em seguida, as células foram ressuspensas com 1 mL de meio LB e transferidas para um tubo falcon que permaneceu a 28 °C por 30 min a uma agitação de 200 rpm para que houvesse a recuperação das células. Posteriormente, as células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo Canamicina 50 µg/µL (antibiótico de seleção do vetor) para a seleção das células transformadas. As placas foram incubadas a 28 °C por 48 h.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tecnologia das técnicas de DNA recombinante fez com que fosse possível a produção de fragmentos funcionais de anticorpos, método denominado engenharia de anticorpos. Este método é baseado na manipulação das sequências codificantes dos fragmentos, possibilitando gerar várias combinações funcionais de anticorpos que apresentam grande potencial clínico. O scFv é um dos anticorpos mais utilizados nesse tipo de metodologia. (CARDOSO, 2008).

4.1. Confirmação e amplificação do gene scFv-SVMP por PCR a partir do seu DNA genômico

As sequências dos primers desenhados na ferramenta PrimerQuest são mostrados na Figura 3, seguidos da sua temperatura de melting (T_m).

<i>Primer</i>	Sequência	T_m (°C)
Forward	TCGCGACCCGGGTTAAT	56,7
Reverse	CCTAGGTCTAGACTCGAGTCAGGA	58,2

Figura 3: Sequência dos *primers* desenhados e suas respectivas temperaturas de anelamento.

Os primers foram desenhados para que fosse possível realizar a amplificação do gene codificante do anticorpo scFv-SVMP por PCR, que foi visualizada por eletroforese. A presença do fragmento do gene codificante e sua amplificação foram confirmadas através da altura das

bandas das colônias 1, 2, 3 e 4 próximo a altura que o marcador molecular marca 900 pb, apresentada no gel de agarose 1%.

O gene codificante do scFv-SVMP (figura 4) apresenta uma massa molecular de 882 pb e, como pode-se observar na Figura 5, as bandas dos genes codificantes do anticorpo scFv-SVMP aparece na altura próxima na qual o padrão de peso molecular marca 900 pb. Sendo este o esperado para o gene codificante do scFv-SVMP.

```
TCGCGACCCGGGTTAATTAAATGAAAAACACTTCTTCTTTATGCTTGCTCCTTCTCGTGGTGC
TTTGTAGTCTCACTTGTAACCTCTGGACAGGCTCTCACTCAACCTTCTTCAGTTTCTGCTAATTTG
GGAGGTACTGTGGAATACATGTTTCAGGAGGTAGTTCCTCTGGTTATGGATACTCTTGGTAT
CAACAGAAGTCTCCAGGTTTCAGCTCCTGTTACAGTGATCTACAGTAACGATAAAAGACCATCC
GATATTCCTAGTAGGTTTTCCGGTGCACCTCTCAGGAAGTACTTCCACACTTACTATTACAGGTG
TTCAAGTGGAAGATGAGGGAGTTTATTACTGTGGTTCCTGGAGATTCAACTTATGTGGGTATAT
TCGGTGCTGGAACATGACAGTTTTAGGACAATCTTCTAGGTCTTCTGCTGTTACTTTGGA
TGAATCAGGAGGTGGATTACAGACTCCAGGTGGAACACTTCTTTGGTTTGCAAGGCTTCTGG
TTTTACTTTTTCTGATTACGGTATGGGATGGGTAGGCAAGCTCCTGGTAAAGGACTTGAGTTT
GTGGCATCAATACAGAATGATGGTAGTTATCCTAACTACGGTTCCTGCTGTTAAGGGAAGAGCA
ACTATCTCAAGGGATAATGGTCAAAGTACATTAAGACTCCAGCTTAATAACCTTAGGGCTGAA
GATACTGCAACATATTTCTGCGCTAAACTAGTATGATCTATTCCCTTCAAGTGATAGAATA
GATGCATGGGGTCATGGAAGTGGGTTATTGTGTCCTCTACATCACACCACCACCACCAC
GGAGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTCCTGACTCGAGTCTAGACTTAGG
```

Figura 4: Sequência do gene codificante do scFv-SVMP. As sequências destacadas apresentam sítios ativos para enzimas de restrição, sendo elas NruI, SmaI, PacI, XhoI, XbaI e AvrII, respectivamente. A sequência apresenta também sequência Kozak, RAmySP, sequência do gene de interesse scFv-SVMP1, 6x-His Tag, GA, HA Tag e Stop Codon para tradução da proteína (TGA).

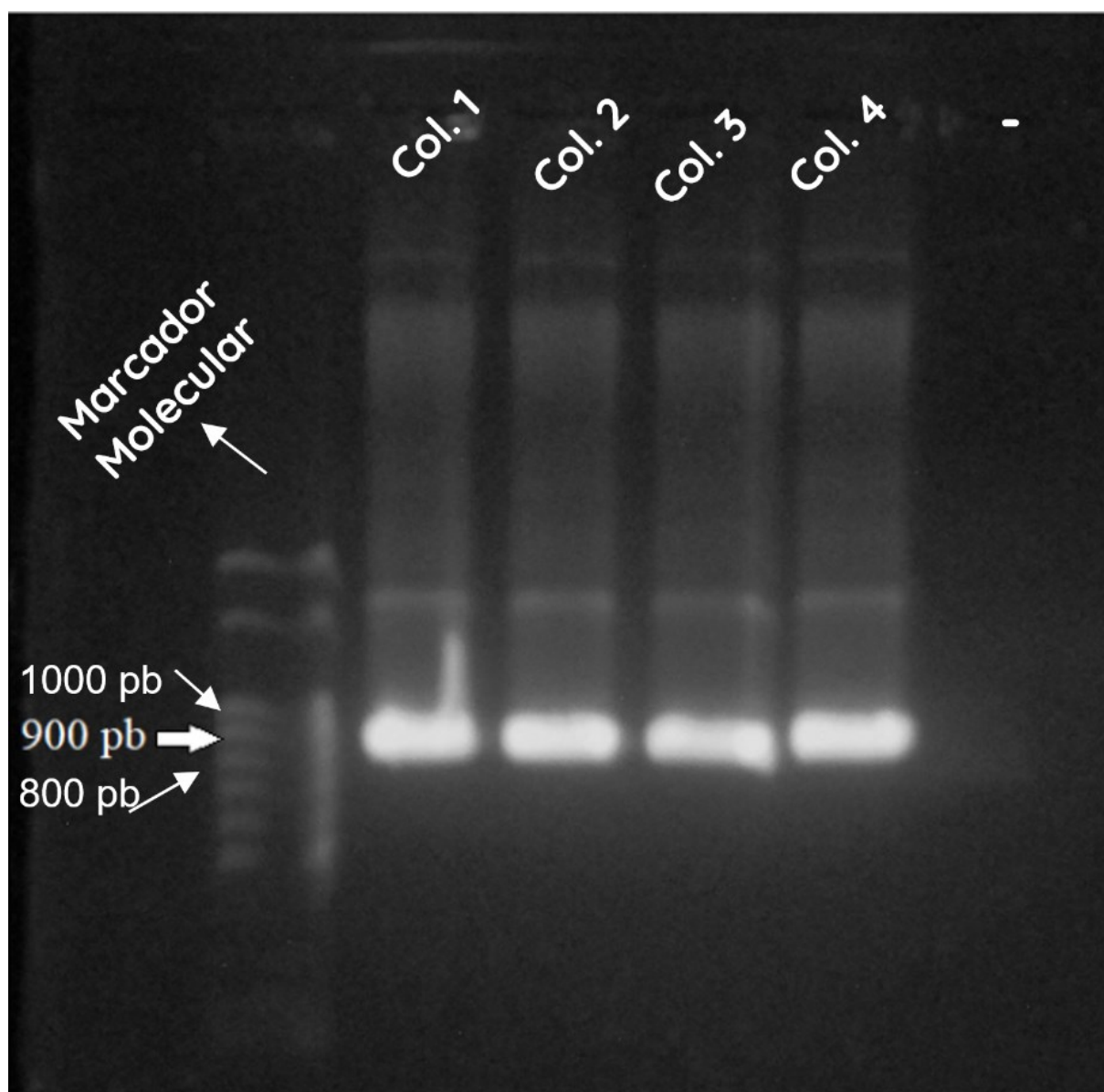


Figura 5: Produto da PCR de DNA genômico de *DH5α* para o gene scFv-SVMP. Gel de agarose 1%, revelado com GelRed, visualizado em transiluminador fotografado. Canaleta 1: Marcador de Peso Molecular Ladder 100 pb (*Ludwig Biotec*) ; Canaleta 2: Resultado da PCR para a amplificação do gene scFv-SVMP da colônia 1; Canaleta 3: Resultado da PCR para a amplificação do gene scFv-SVMP da colônia 2; Canaleta 4: Resultado da PCR para a amplificação do gene scFv-SVMP da colônia 3; Canaleta 5: Resultado da PCR para a amplificação do gene scFv-SVMP da colônia 4; Canaleta 6: Controle negativo.

4.2. Digestão do gene scFv-SVMP e do vetor pEAQ-HT com as enzimas de restrição

NruI e XhoI

Foi realizada a reação de digestão do gene codificante do scFv-SVMP e do vetor pEAQ-HT, que possui 2800 pb, com as enzimas de restrição NruI e XhoI. Na figura 4 é possível visualizar a região onde se encontram os sítios ativos das enzimas de restrição no gene de interesse. Em seguida, para a confirmação da digestão, analisou-se os tamanhos dos fragmentos obtidos por eletroforese. As figuras 6 e 7 mostram o resultado da digestão, com o tamanho dos fragmentos esperados, tanto do gene scFv-SVMP quanto do vetor pEAQ-HT, respectivamente.

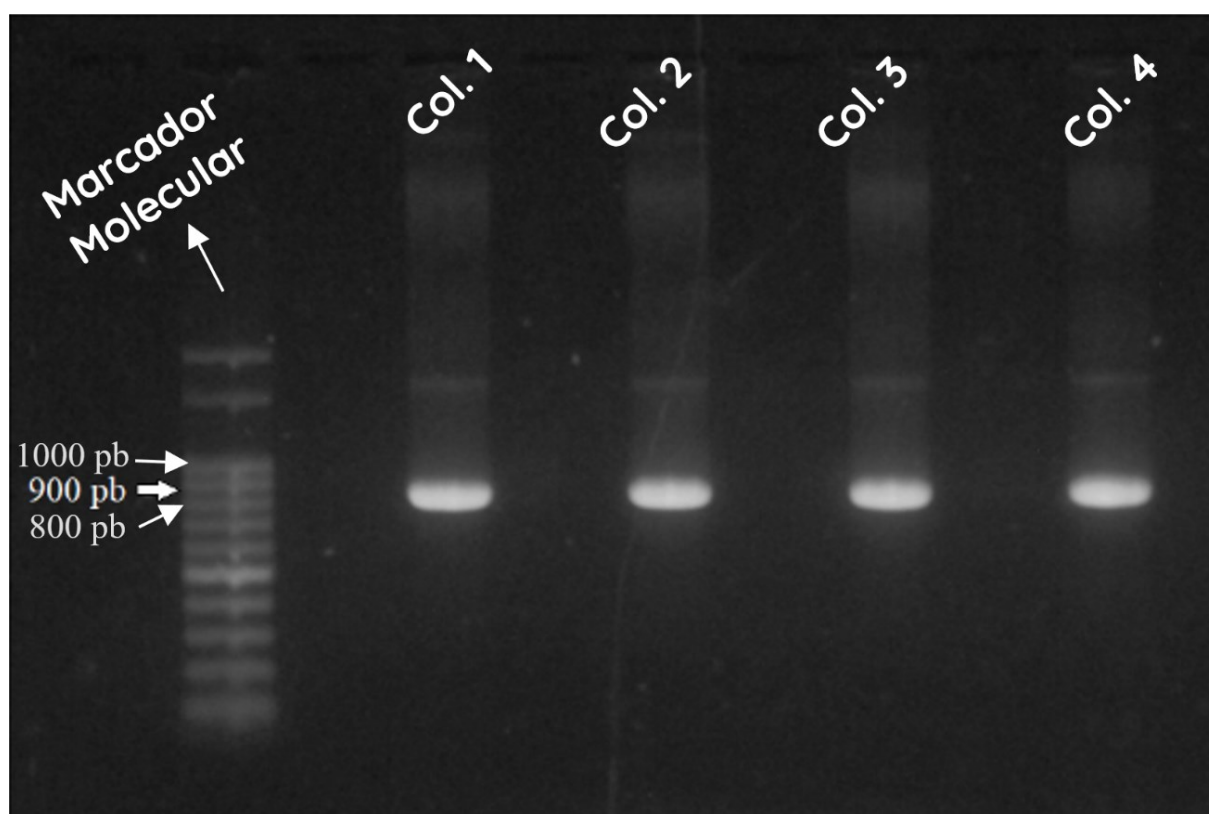


Figura 6: Produto da digestão do gene scFv-SVMP. Gel de agarose 1%, corado com GelRed, visualizado em transiluminador fotografado. Canaleta 1: Marcador de Peso Molecular Ladder 100 pb (*Ludwig Biotec*); Canaleta 2: Resultado da digestão do gene scFv-SVMP, colônia 1; Canaleta 3: Resultado da digestão do gene scFv-SVMP, colônia 2; Canaleta 4: Resultado da digestão do gene scFv-SVMP, colônia 3; Canaleta 5: Resultado da digestão do gene scFv-SVMP, colônia 4.

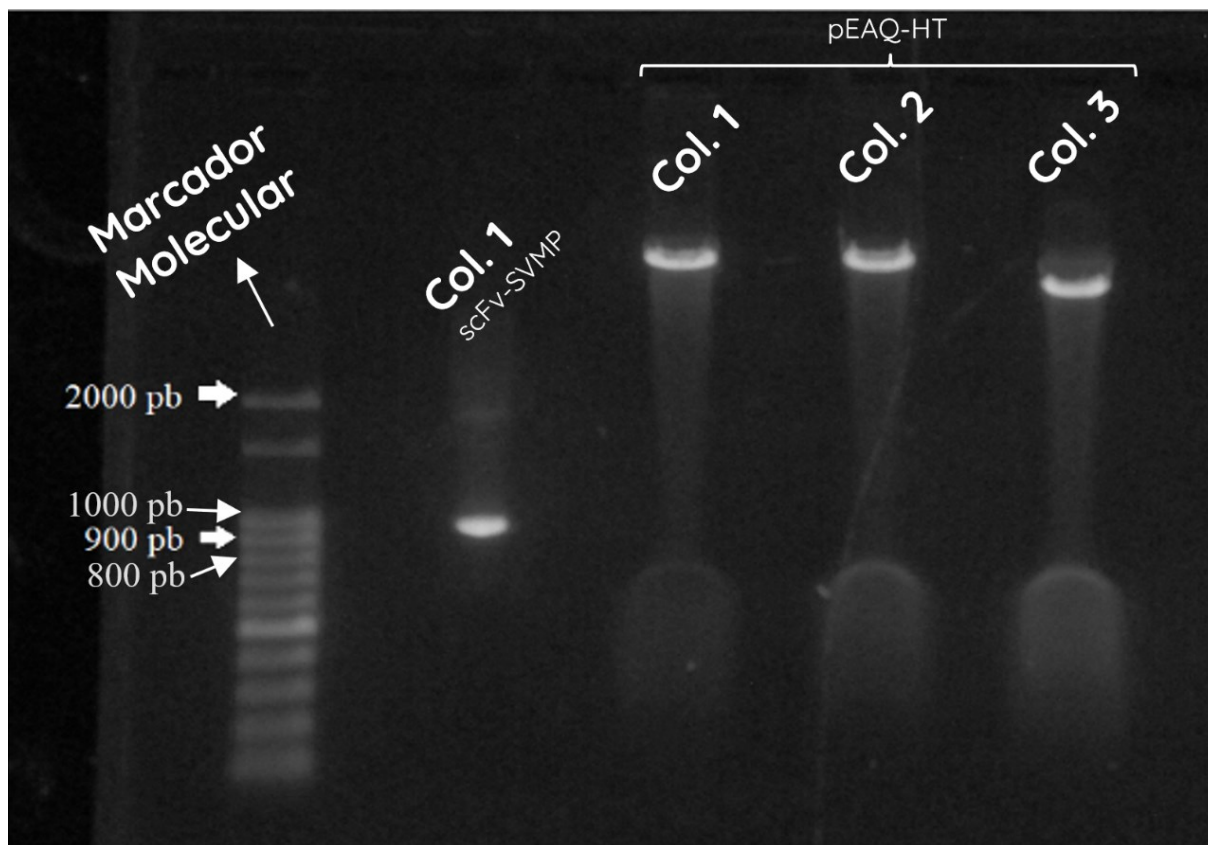


Figura 7: Produto da digestão do gene scFv-SVMP e do vetor pEAQ-HT. Gel de agarose 1%, corado com GelRed, visualizado em transiluminador fotografado. Canaleta 1: Marcador de Peso Molecular Ladder 100 pb (*Ludwig Biotec*); Canaleta 2: Resultado da digestão do gene scFv-SVMP, colônia 1; Canaleta 3: Resultado da digestão do vetor pEAQ-HT, colônia 1; Canaleta 4: Resultado da digestão do vetor pEAQ-HT, colônia 2; Canaleta 5: Resultado da digestão do vetor pEAQ-HT, colônia 3.

4.3. Confirmação da inserção do gene codificante do anticorpo scFv-SVMP no vetor pEAQ-HT

Após a digestão do gene codificante do anticorpo scFv-SVMP e do vetor pEAQ-HT, foi realizada uma reação de ligação para que houvesse a inserção do gene codificante do anticorpo scFv-SVMP no vetor pEAQ-HT. Após a reação ser concluída, foi realizada uma PCR, utilizando o produto da reação de ligação, seguida da visualização por eletroforese, em gel de

agarose 1%, sendo possível a confirmação da inserção do gene no vetor. A Figura 8 mostra o resultado da eletroforese, a qual mostra que apenas na colônia 3 houve a inserção do gene no vetor.

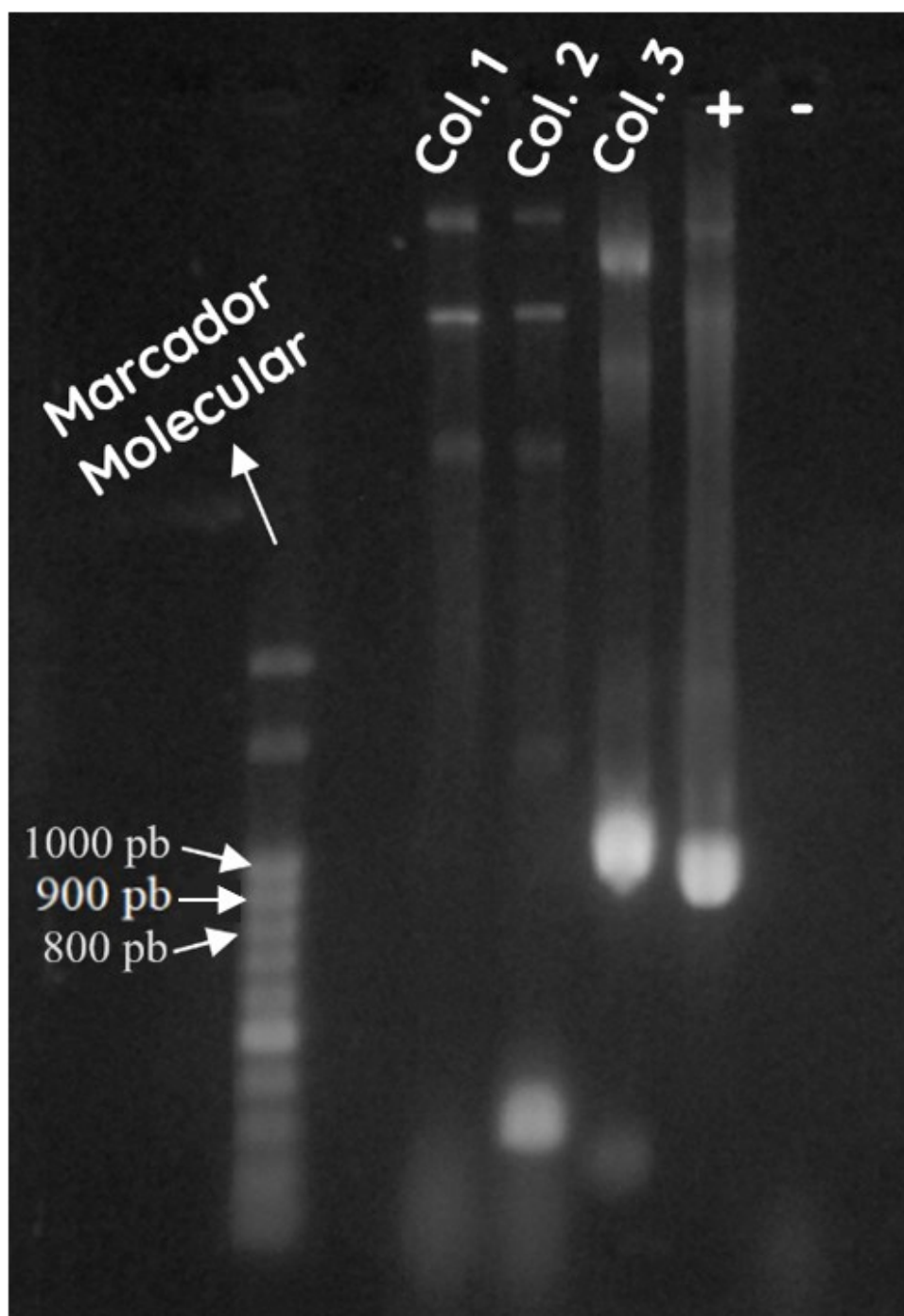


Figura 8. Confirmação da reação de ligação. Gel de agarose 1%, corado com GelRed, visualizado em transiluminador fotografado. Canaleta 1: Marcador de Peso Molecular Ladder 100 pb (*Ludwig Biotec*); Canaleta 2: DNA extraído da colônia 1 de *E.coli* DH5 α eletroporada com o produto da reação de ligação; Canaleta 3: DNA extraído da colônia 2 de *E.coli* DH5 α eletroporada com o produto da reação de ligação; Canaleta 4: DNA extraído

da colônia 3 de *E.coli* DH5 α eletroporada com o produto da reação de ligação; Canaleta 5: Controle positivo; Canaleta 6: Controle negativo.

4.4. Transformação de células eletrocompetentes

Após confirmada a inserção do gene no vetor, o produto da reação de ligação foi eletroporado em *R. radiobacter* eletrocompetentes, as quais posteriormente foram plaqueadas em placa de petri contendo meio LB sólido e Canamicina 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. As células transformadas foram selecionadas a partir do gene de resistência à Canamicina 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ contido no vetor pEAQ-HT, como mostra a Figura 9.

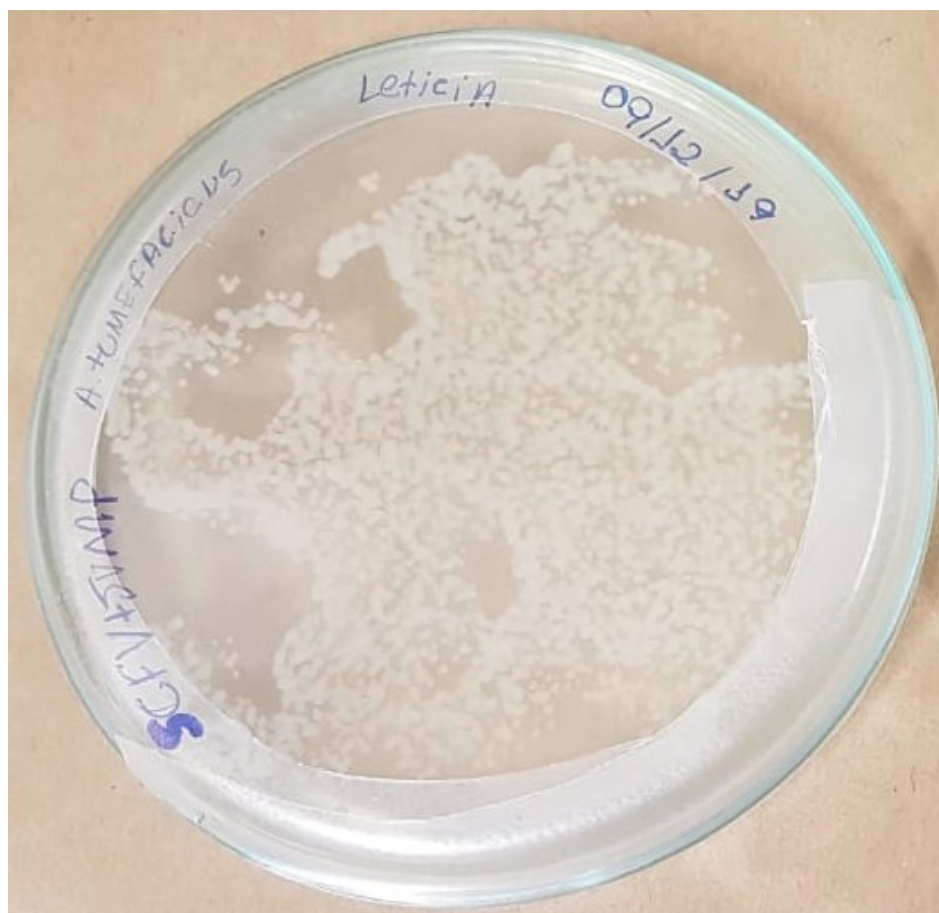


Figura 9. Transformação de *R. radiobacter* eletrocompetentes. Colônia de *R. radiobacter* selecionadas com Canamicina 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

5. CONCLUSÃO

A clonagem do gene codificante do anticorpo scFv-SVMP proposta foi concluída, mostrando que os primers desenhados foram eficientes na amplificação do gene, e que as reações de PCR, digestão, ligação e transformação foram eficazes.

Espera-se que a continuidade desse estudo leve a possível expressão transiente do anticorpo scFv-SVMP em *Nicotiana benthamiana* e sua purificação, para que posteriormente haja uma avaliação de reação cruzada do anticorpo recombinante scFv-SVMP com diversas peçonhas de serpentes, para que este seja, futuramente, uma alternativa ao método de produção atual de antiveneno.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, V. A.; BELO, C. A. D.; HERNANDES-OLIVEIRA, S. S.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; HYSLOP, S.; FURTADO, M.D.F.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (B-n. goyazensis, B-n. paranaensis and B-n. diporus). **Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.**, v. 148, n. 1, p. 142-149, 2007.

ALAM, J. M.; QASIM, R.; ALAM, S. M. Enzymatic activities of some snake venoms from families Elapidae and Viperidae. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences.**, v. 9, n. 1, p. 37-41, 1996.

ARNOLD, C. Synthetic biology tackles global antivenom shortage. **Nature**, [S. l.], ano 2016, v. 532, p. 292, 21 abr. 2016.

AZZAZY, H. M. E.; HIGHSMITH JR, W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical Biochemistry**, [S. l.], ano 2012, v. 35, p. 425-445, set. 2002.

BODE, W.; GOMIS-RIITHB, F. X.; STICKLER, W. Astacins, serralsins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. **FEBS LETTERS**, [S. l.], ano 1993, v. 331, n. 1-2, p. 134-140, 9 ago. 1993.

BUGLI, F.; GRAFFEO, R.; STERBINI, F. P.; TORELLI, R.; MASUCCI, L.; SALI, M.; GRASSO, A.; RUFINI, S.; RICCI, E.; FADDA, G.; PESCATORI, M. Monoclonal antibody

fragment from combinatorial phage display library neutralizes alpha-latrotoxin activity and abolishes black widow spider venom lethality, in mice. **Toxicon**, [S. l.], ano 2008, v. 51, p. 547-554, 10 out. 2008.

CARDOSO, Rone. **Construção de uma biblioteca de fragmentos de anticorpos monoclonais apresentados em fagos e seleção de clone neutralizante de toxinas presentes na peçonha de Bothrops pauloensis**. 2008. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

CARRASCO, P. A.; MATTONI, C. I.; LEYNAUD, G. C.; SCROCCHI, G. J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, [S. l.], ano 2012, v. 41, p. 109-124, 7 fev. 2012.

CHAMES, P.; REGENMORTEL, M. V.; WEISS, E.; BATY, D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], ano 2009, v. 157, p. 220-233, 12 jan. 2009.

COOPER, G. M. and HAUSMAN, R. E. *The Cell: A molecular Approach*. 4d ed. Amer. Soc. Microbiol., **Washington and Sinauer Assoc.**, Sunderland, MA, 2007.

FRANÇA, F.; MÁLAQUE, C. Acidente botrópico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD-JUNIOR, V. (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2. São Paulo: Sarvier, 2009. p.8195.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B. **Introdução à Genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. ISBN 978-85-277-1497-6.

GOIS, P. H. F.; MARTINES, M. S.; FERREIRA, D.; VOLPINI, R.; CANALE, D.; MALAQUE, C.; CRAJOINAS, A.; GIRARDI, A. C. C.; SHIMIZU, M. H. M.; SEGURO, A. C. Allopurinol attenuates acute kidney injury following Bothrops jararaca envenomation. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], ano 2017, v. 11, p. 151-175, 20 nov. 2017.

GUTIÉRREZ, J. M. Understanding and confronting snakebite envenoming: The harvest of cooperation. **Toxicon**, [S. l.], ano 2016, v. 109, p. 51-62, 23 nov. 2015.

HUSTSON, J. S., LEVINSON, D., MUDGETT-HUNTER, M., TAI, M. S., NOVOTNÝ, J., MARGOLIES, M. N., RIDGE, R. J., BRUCCOLERI, R. E., HABER, E., CREA, R. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], ano 1988.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; SILVA, N. de; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; SILVA, H. J. de. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. **Plos Medicine**, [S. l.], v. 5, p. 1591-1604, 4 nov. 2008.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochemical Journal**, [S. l.], ano 2006, v. 397, p. 377-387, 13 jul. 2006.

LAUSTSEN, A. H.; ENGMARK, M.; MILBO, C.; JOHANNESSEN, J.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOHSE, B. From Fangs to Pharmacology: The Future of Snakebite Envenoming Therapy. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], ano 2016, v. 22, n. 34, p. 5270-5293, 8 jan. 2016.

LAUSTSEN, A. H.; GUTIÉRREZ, J. M.; KNUDSEN, C.; JOHANSEN, K. H.; MÉNDEZ, E. B.; CERNI, F. A.; JÜRGENSEN, J. A.; ØHLENSCHLÆGER, M.; LEDSGAARD, L.; ESTEBAN, A. M.; PUS, U.; ANDERSEN, M. R.; LOMONTE, B.; ENGMARK, M.; PUCCA, M. B. Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. **Toxicon**, [S. l.], ano 2017, v. 148, p. 151-175, 7 mar. 2018.

MCCAFFERTY, J., GRIFFITHS, A. D., WINTER, G., CHISWELL, D. J. Phage antibodies filamentous phage displaying antibody variable domains. **Nature**, v.348, p.552–554, 1990.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; SERRANO, S. M. T.; FOX, J. W.; GUTIÉRREZ, J. M. Snake Venom Metalloproteinases: Structure, function and effects on snake bite pathology. In: UFMG (Ed.). **Animal Toxins: State of the Art**. Belo Horizonte, 2009. p.402-422.

SACHETT, J. A. G.; SILVA, I. M. da; ALVES, E. C.; OLIVEIRA, S. S.; SAMPAIO, V. S.; VALE, F. F. do; ROMERO, G. A. S.; SANTOS, M. C. dos; MARQUES, H. O.; COLOMBINI, M.; SILVA, A. M. M. da; WEN, F. H.; LACERDA, M. V. G.; MONTEIRO, W. M.; FERREIRA, L. C. L. Poor efficacy of preemptive amoxicillin clavulanate for preventing secondary infection from Bothrops snakebites in the Brazilian Amazon: A randomized

controlled clinical trial: A randomized controlled clinical trial. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], ano 2017, v. 11, p. 1-21, 10 jul. 2017.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, [S. l.], v. 57, p. 627-645, 26 jan. 2011.

SELISKO, B.; COSÍO, G.; GARCÍA, C.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D.; HORJALES, E. Bacterial expression, purification and functional characterization of a recombinant chimeric Fab derived from murine mAb BCF2 that neutralizes the venom of the scorpion *Centruroides noxius hoffmanni*. **Toxicon**, [S. l.], ano 2004, v. 43, p. 43-51, 10 out. 2003.

SOUSA, L. F.; NICOLAU, C. A.; PEIXOTO, P. S.; BERNARDONI, J. L.; OLIVEIRA, S. S.; PORTES-JUNIOR, J. A.; MOURÃO, R. H.; LIMA-DOS-SANTOS, I.; SANO-MARTINS, I. S.; CHALKIDIS, H. M.; VALENTE, R. H.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of bothrops complex. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, p. e2442, 2013.

STOCKER, W.; BODE, W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases - the metzincins. **Current opinion structural biology**, v. 5, n. 3, p. 383-390, 1995.

STOGER, E.; SACK, M.; FISCHER, R.; CHRISTOU, P. Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. **Current opinion in biotechnology**, [S. l.], ano 2002, v. 13, p. 161-166, 11 dez. 2002.

TAMAROZZI, M. B.; SOARES, S. G.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; BARBOSA, J. E. Expression of recombinant human antibody fragments capable of inhibiting the phospholipase and myotoxic activities of Bothrops jararacussu venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [S. l.], ano 2006, v. 1760, p. 1450-1457, 14 fev. 2006.

WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R.; HARRISON, S. C. **Biologia Molecular do Gene**. 7. ed. [S. l.]: Artmed, 2015. 878 p. ISBN 9780321762436.

WATSON, J. D.; MYERS, R. M.; CAUDY, A. A.; WITKOWSKI, J. A. **DNA Recombinante: Genes e Genomas**. 3. ed. [S. l.]: Artmed, 2009. 474 p. ISBN 9780716728665.

YU, F.; WANG, Y.; XIAO, Y.; HE, Y.; LUO, C.; DUAN, D.; LI, C.; XU, S.; XIANG, T. RP215 single chain fragment variable and single domain recombinant antibodies induce cell cycle arrest at G0/G1 phase in breast cancer. **Molecular Immunology**, [S. l.], ano 2014, v. 59, p. 100-109, 8 jan. 2014.

ZHANG, Z. L.; ZHANG, J. F.; YUAN, Y. F.; HE, Y. M.; LIU, Q. Y.; MAO, X. W.; AI, Y. B.; LIU, Z. S. Suppression of angiogenesis and tumor growth in vitro and in vivo using an anti-angiopoietin-2 single-chain antibody. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [S. l.], ano 2014, v. 7, p. 543-552, 7 jan. 2014.