UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Expressão e caracterização de uma protease de interesse biotecnológico
clonada da glândula de peçonha de *Crotalus durissus collilineatus***

Johara Boldrini França

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Expressão e caracterização de uma protease de interesse biotecnológico
clonada da glândula de peçonha de *Crotalus durissus collilineatus***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia.

Orientada: Johara Boldrini França

Orientadora: Dra Eliane Candiani Arantes Braga

Coorientador: Dr. Flávio Henrique da Silva

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Toxicologia em 10/05/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Boldrini-França, Johara

Expressão e caracterização de uma protease de interesse biotecnológico clonada da glândula de peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*. Ribeirão Preto, 2013.

144 p. : il. ; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Arantes, Eliane Candiani.

1. Peçonha de serpentes 2. *Crotalus durissus* 3. Serinoproteases 4. Hemostasia 5. Expressão heteróloga.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Johara Boldrini França

Expressão e caracterização de uma protease de interesse biotecnológico clonada da glândula de peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Dra Eliane Candiani Arantes Braga

Coorientador: Dr. Flávio Henrique da Silva

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

***Dedico este trabalho aos meus queridos pais Gilberto França e Marlene
Boldrini França, que são responsáveis pela minha mais importante formação!***

A vocês o meu eterno amor e gratidão!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todos os momentos bons e principalmente pelas dificuldades que encontro no caminho, pois são essas as oportunidades de amadurecimento e aprendizado.

À minha família que é meu alicerce e compõe o aspecto mais importante da minha vida! Meus pais Gilberto e Marlene, minhas irmãs Janaina e Jaciara, meus sobrinhos João Matheus e Nathália e minha vó Elza: amo vocês incondicionalmente!

Ao meu amor Leandro Vicari Saraceni Rodrigues. Seu companheirismo e paciência comigo durante todo esse tempo só me faz te amar ainda mais! Você me incentiva e me apoia como ninguém! Agradeço a Deus sempre por ter permitido que você entrasse na minha vida! Você é o homem que eu quero todos os dias ao meu lado e espero poder retribuir tudo que você faz de bom para mim! Eu te amo!

À professora Dr^a. Eliane Candiani Arantes Braga, por ter me concedido o privilégio desta orientação e por todo o comprometimento com a qualidade deste trabalho. Prof^a. Eliane, a senhora é mais que uma orientadora! É uma mãe e uma amiga para todos os seus alunos! Isso foi o diferencial que me ajudou a superar as dificuldades com muita energia e otimismo!

À amiga e irmã científica Prof^a. Dr^a. Renata Santos Rodrigues, que compartilhou os principais momentos pessoais e profissionais da minha vida, tornando-os sempre muito especiais! Não consigo imaginar um momento sequer da minha vida acadêmica sem associá-lo a você. Não menos importante é a sua presença na minha vida pessoal, pois está sempre disposta a compartilhar alegrias e dividir o peso das aflições. Amo você minha amiga e tenho certeza que esse encontro não foi por acaso!

A minha eterna gratidão à professora Dr^a. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila que sempre acreditou em mim e por estimular sempre meu crescimento! Muito do que eu sou hoje devo a você! Agradeço por todos os ensinamentos que tanto me ajudaram a trabalhar sempre com ética, amor e dedicação! Você é um exemplo a ser seguido!

Ao meu querido coorientador Prof. Dr. Flávio Henrique Silva, que está sempre disposto a ajudar e é tão dedicado à formação científica de todos que com ele trabalham. Professor, obrigada por me conceder a oportunidade do estágio em São Carlos que tanto

contribuiu para a realização deste trabalho e para meu aprendizado! Foi uma honra trabalhar com seu grupo, que é repleto de pessoas maravilhosas!

Prof. Dr. Juan J. Calvete e Dr^a Lúbia Sanz, obrigada por terem me concedido o privilégio de trabalhar com vocês!

Aos Professores Dr. Edwin de Pauw e Dr. Loic Quinton por toda a contribuição científica e hospitalidade!

Ao Prof. Dr. Andreimar Martins Soares, que me orientou nos primeiros anos do doutorado e teve importante participação na minha formação acadêmica.

À professora Dr^a. Maria Inês Homs Brandeburgo, pela importante contribuição na minha formação e por sempre acreditar em mim.

À Prof^a. Dr^a. Cristina Nonato por toda a contribuição no desenvolvimento desse trabalho e de várias outras pesquisas do Laboratório de toxinas animais.

À Dr^a. Karla de Castro Figueiredo Bordon, que é responsável por grandes realizações em nosso grupo de pesquisa, além de ajudar a todos os colegas de laboratório, sempre com muita sabedoria, conhecimento e organização! Você é uma amiga muito querida!

À amiga Iara, que está sempre disposta a ajudar com um sorriso no rosto e tanto contribui com o funcionamento do laboratório! Saiba que sua presença melhora muito o astral de todos!

Um agradecimento especial a Fernanda, Francielle, Fernando e Ernesto! Meus amigos tão queridos que trouxeram tanta alegria aos meus dias de trabalho! Uma das melhores coisas que levo desse período foi conhecer vocês! Vou carregá-los para sempre em meu coração!

Aos amigos do Laboratório de Toxinas Animais (LTA): Carol, Felipe, Manuela, Priscila Carmanhan, Priscila Shibao, Gisele, Amanda, Tibério, Matheus, Elisa e Cristiane. Foi

muito bom trabalhar na companhia de vocês, e nossos momentos de diversão foram todos muito especiais!

Aos meus queridos amigos Norival, Lucas, Danilo, Tássia, Carol Petri, Cleyton, Silvana e Renata! Passamos por ótimos momentos juntos, e o mais importante é que nos apoiamos uns nos outros para superarmos o momento mais difícil de nossas carreiras! Vocês foram fundamentais para mim nesse momento!

À amiga Dra. Camila Takeno Cologna, por ter me recebido de braços abertos na Bélgica e por tanto me ensinar sobre espectrometria de massas! Nossa convivência durante esses dias na Bélgica foi ótima e são momentos que vou guardar por toda a vida!

À querida amiga Dr^a. Ludier Kesser Santos Silva. Vou ser sempre grata pela sua ajuda, que foi fundamental para o desenvolvimento desse trabalho! Dessa colaboração nasceu uma amizade muito especial!

Aos amigos do Laboratório de Cristalografia de Proteínas (LCP) Matheus, Joane, Patrícia, Ricardo, Juliana, Aline e Giovane pela colaboração e ótima companhia!

Ao amigo Dr. Fernando Fonseca Pereira de Paula pela amizade e por toda a ajuda prestada. Devo a você muito do que sei no campo da Biologia Molecular. Você é uma pessoa que merece todo o sucesso do mundo sempre!

À amiga Dayane, sempre comprometida em ajudar! Você é uma amiga e colaboradora maravilhosa!

Ao amigo Mário Sérgio por toda a colaboração com este trabalho!

Aos amigos do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais: Daiana, Fernanda, Márcia, Sara, Letícia, Débora, Lino, David, Ana Carolina, Thaís e Marina. Uberlândia é um lugar muito especial por causa de vocês!

Aos amigos da Espanha Marliete, Pilar, Paula, Jordi, Gemma e Alice pela grande contribuição científica e pela ótima convivência durante meu estágio na Universidade de Valência.

A toda a minha família e amigos que tornam minha vida muito mais leve e prazerosa!

A CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro que foi essencial para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*"Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor
se adapta às mudanças"*

Charles Darwin

RESUMO

BOLDRINI-FRANÇA, J. **Expressão e caracterização de uma protease de interesse biotecnológico clonada da glândula de peçonha de *Crotalus durissus collilineatus***. 2012. 144f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

As serinoproteases de peçonha de serpentes (SVSPs) agem sobre pontos específicos do sistema circulatório, sendo consideradas promissoras para o tratamento de uma diversidade de desordens hemostáticas. No presente estudo, é descrita a expressão de uma serinoprotease de *Crotalus durissus collilineatus* (Collineina-1) em *Pichia pastoris*, bem como a purificação dessa toxina a partir da peçonha de *C. d. collilineatus* e a caracterização estrutural e enzimática da Collineina-1 nas formas nativa e recombinante. O cDNA que codifica a serinoprotease foi amplificado a partir da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha de *C. d. collilineatus* e ligado ao vetor pPICZαA. A linhagem KM71H de *P. pastoris* foi transformada com o plasmídeo recombinante e as colônias foram selecionadas por resistência à zeocina. A expressão heteróloga foi realizada em meio mínimo suplementado com metanol, resultando em um rendimento de 56 mg de proteína por litro de cultura. A proteína recombinante foi purificada por um protocolo baseado em técnicas cromatográficas de troca iônica e fase reversa. A purificação da serinoprotease a partir da peçonha de *C. d. collilineatus* foi realizada pela combinação de técnicas de cromatografia de exclusão molecular, troca iônica e fase reversa, e resultou no isolamento de duas isoformas, denominadas Collineina-1 e 2. Quando analisada por espectrometria de massas, a Collineina-1 recombinante apresentou massa molar de 28.868 Da, enquanto as enzimas Collineina-1 e 2 apresentaram massas de 29.475 Da e 29.388 Da, respectivamente. A partir do alinhamento das sequências parciais das serinoproteases, foi possível determinar 100% de identidade dos aminoácidos para a Collineina-1 nativa e recombinante. O alinhamento múltiplo da sequência deduzida de aminoácidos da Collineina-1 indica uma semelhança estrutural dessa proteína com outras serinoproteases de peçonha de serpente. As enzimas nativa e recombinante mostraram efeitos similares sobre fibrinogênio bovino por clivarem preferencialmente a cadeia Aα do fibrinogênio, liberando o fibrinopeptídeo A. Ambas as enzimas induziram a coagulação do plasma bovino de forma dose-dependente, sendo que a Collineina-1 recombinante apresentou maior potencial coagulante, com uma dose mínima coagulante (DMC) de 0,08 µg/µL contra 0,225 µg/µL para a proteína nativa. As serinoproteases foram capazes de hidrolisar os substratos cromogênicos S-2222, S-2238 e S2302, embora ambas as enzimas tenham demonstrado maior atividade sobre o substrato S-2302. A atividade esterásica sobre o TAME foi avaliada em diferentes condições de temperatura e na presença de íons divalentes. As duas enzimas demonstraram alta termoestabilidade e tiveram a atividade inibida na presença dos íons Zn^{2+} e Cu^{2+} . A cinética enzimática de ambas as serinoproteases seguiram o modelo de Michaelis-Menten. A Collineina-1 nativa apresentou um valor de K_m de 1,43 mM, contra 1,682 mM para a proteína recombinante, indicando que a proteína nativa apresenta maior afinidade pelo substrato TAME. No entanto, as enzimas apresentaram valores similares de K_{cat}/K_m (250,69 mM.min⁻¹ para a Collineina-1 e 248,03 mM.min⁻¹ para a rCollineina-1), sugerindo que as serinoproteases não diferem significativamente na eficiência em hidrolisar o substrato. Estes resultados demonstraram a adequação do sistema de escolha na produção heteróloga da Collineina-1, já que a proteína recombinante foi expressa com integridade funcional sobre os parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Peçonha de serpentes, *Crotalus durissus*, serinoproteases, hemostasia, expressão heteróloga.

ABSTRACT

BOLDRINI-FRANÇA, J. **Expression of a protease of biotechnological interest cloned from *C. d. collilineatus* venom gland.** 2012. 144f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Snake venom serine proteases (SVSPs) act on specific points of the circulatory system and are promising for the treatment of a variety of hemostatic disorders. In the present study, we describe the expression of a serine protease from *Crotalus durissus collilineatus* (Collineina-1) in *Pichia pastoris*, the purification of the native toxin from *C. d. collilineatus* venom and the structural and enzymatic characterization of Collineina-1 in native and recombinant forms. The cDNA encoding the serine protease was amplified from cDNA library of *C. d. collilineatus* venom gland and cloned into pPICZαA vector. KM71H *P. pastoris* strain was transformed with the recombinant plasmid and colonies were selected by zeocin resistance. Heterologous expression was carried out in minimal medium supplemented with methanol, resulting in a yield of 56 mg of protein per liter of culture. The recombinant protein was purified by ion exchange and reverse phase chromatography. Purification of the native serine protease was accomplished by combining techniques of molecular exclusion, ion exchange and reversed phase, and resulted in the isolation of two isoforms, named Collineina-1 and 2. When analyzed by mass spectrometry, the recombinant Collineina-1 showed a molar mass of 28,868 Da, while Collineina-1 and 2 presented masses of 29,475 and 29,388 Da, respectively. The alignment of partial sequences of the enzymes resulted in 100% of amino acid identity between native and recombinant Collineina-1. The multiple alignment of deduced amino acid sequence of Collineina-1 indicates structural similarity with other snake venom serine proteases. The native and recombinant forms of the enzyme showed similar effects on bovine fibrinogen by cleaving preferentially Aα chain, releasing fibrinopeptide A. Both enzymes induced coagulation of bovine plasma in a dose-dependent way, though recombinant Collineina-1 presented a higher coagulant potential, with a minimum coagulant dose (MCD) of 0.08 mg/uL against 0.225 mg/uL for the native form. The serine proteases hydrolyzed S-2222, S-2238 and S2302 chromogenic substrates, although both enzymes demonstrated increased activity upon S-2302. The esterase activity on TAME was evaluated at different temperatures and in the presence of divalent ions. Both enzymes showed high thermostability and their activity were inhibited in the presence of Zn^{2+} and Cu^{2+} . The enzyme kinetics of both serine proteases followed Michaelis-Menten model. The native Collineina-1 showed a K_m value of 1.43 mM, against 1.682 mM for the recombinant form, indicating that the native protein has a higher affinity for TAME substrate. However, enzymes had similar values for K_{cat}/K_m (250.69 mM.min⁻¹ for Collineina-1 and 248.03 mM.min⁻¹ for rCollineina-1), suggesting that the serine proteases did not differ significantly in the efficiency to hydrolyze the substrate. These results demonstrated the adequacy of the system of choice in producing the snake venom serine protease, since the recombinant protein was expressed with functional integrity on the evaluated parameters.

Keywords: Snake venoms, *Crotalus durissus*, serine protease, hemostasis, heterologous expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimativas regionais da ocorrência de envenenamentos decorrentes de acidentes ofídicos no mundo.....	2
Figura 2. Toxinas de peçonha de serpentes que agem sobre a coagulação sanguínea.....	17
Figura 3. Sequência de nucleotídeos da serinoprotease clonada da glândula de <i>C. durissus collilineatus</i> , denominada Collineina-1, e predição da sequência de aminoácidos.....	41
Figura 4: Eletroforese em gel de agarose do cDNA correspondente à Collineina-1 amplificado por PCR.....	42
Figura 5. Mapa do vetor de expressão pPICZ α	44
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão do vetor e inserto com as enzimas de restrição <i>Xho</i> I e <i>Not</i> I.....	45
Figura 7. Representação esquemática da construção do plasmídeo de expressão pPICZ α A-Collineina1.....	46
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão do DNA plasmidial das colônias transformantes de <i>E. coli</i> com as enzimas de restrição <i>Xho</i> I e <i>Not</i> I.....	47
Figura 9. Sequência de nucleotídeos do plasmídeo recombinante pPICZ α A-Collineina1.....	48
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pPICZ α A-Collineina1 linearizado com a enzima de restrição <i>Sac</i> I.....	49
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR das colônias de <i>P. pastoris</i> transformadas com o plasmídeo pPICZ α A-Collineina1.....	50
Figura 12. Triagem da expressão da Collineina-1 recombinante em colônias de <i>P.</i>	

<i>pastoris</i> selecionadas por zeocina.....	52
Figura 13. Triagem da expressão da Collineina-1 recombinante em diferentes condições de pH e composição do meio.....	54
Figura 14. Perfil cromatográfico do fracionamento das proteínas presentes no meio de cultura em coluna de troca iônica MonoQ.....	56
Figura 15. Perfil cromatográfico da rCollineina-1 em coluna de fase reversa C4.....	57
Figura 16. Perfil cromatográfico do fracionamento da peçonha bruta de <i>C. d. collilineatus</i> por filtração molecular em coluna Sephacryl S-100.....	60
Figura 17. Perfil cromatográfico da fração S3 em coluna de troca iônica MonoQ.....	61
Figura 18. Perfil cromatográfico da fração Q4 em coluna de fase reversa C4.....	62
Figura 19. Espectro de massas da Collineina-1 (A) e Collineina-2 (B).....	65
Figura 20. Espectro de massas da Collineina-1 recombinante.....	66
Figura 21. Alinhamento múltiplo entre as sequências parciais de aminoácidos das serinoproteases nativas e recombinante e da sequência deduzida da Collineina-1.....	67
Figura 22. Alinhamento múltiplo da sequência da Collineina-1 com outras serinoproteases de peçonha de serpentes.....	69
Figura 23. Atividade fibrinogenolítica da Collineina-1 nas formas nativa (A) e recombinante (B).....	71
Figura 24. Perfil de eluição por cromatografia de fase reversa dos fibrinopeptídeos liberados pela ação da Collineina-1 nativa sobre o fibrinogênio.....	74
Figura 25. Perfil de eluição por cromatografia de fase reversa dos fibrinopeptídeos liberados pela ação da Collineina-1 recombinante sobre o fibrinogênio.....	75
Figura 26. Determinação da dose mínima coagulante da Collineina-1 nativa e recombinante.....	76

Figura 27. Atividade catalítica da Collineina-1 nas formas nativa e recombinante sobre os substratos cromogênicos para trombina (S-2251), fator Xa (S-2222), plasmina (S-2251) e calicreína glandular (S-2301).....	78
Figura 28. Efeito da concentração da Collineina-1 nativa (A) e recombinante (B) sobre a hidrólise do substrato cromogênico S-2302.....	80
Figura 29. Efeito de inibidores sobre a atividade da Collineina-1 nas formas nativa e recombinante sobre o substrato S-2302.....	80
Figura 30. Estabilidade da Collineina-1 nas formas nativa e recombinante em diferentes condições de temperatura.....	81
Figura 31. Interferência de diferentes íons divalentes na atividade esterásica da Collineina-1 nativa e recombinante sobre o TAME.....	83
Figura 32. Curva cinética de Michaelis-Menten da Collineina-1 nativa (A) e recombinante (B) para o substrato TAME.....	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Famílias de toxinas de peçonha de serpentes de importância clínica e científica.....	9
TABELA 2 - Serinoproteases isoladas e caracterizadas da peçonha de serpentes do gênero <i>Crotalus</i>	14
TABELA 3 - Recuperação e atividade específica dos passos de purificação da Collineina-1 recombinante, partindo de 100 mL de meio de cultura.....	57
TABELA 4 - Recuperação e atividade específica dos passos de purificação das isoformas de serinoprotease da peçonha de <i>C. d. collilineatus</i>	62
TABELA 5 - Parâmetros cinéticos da Collineina-1 na forma nativa e recombinante para o substrato TAME.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN: acetonitrila

ADP: adenosina difosfato

APC: Ativadores de proteína C

BLAST: ferramenta básica de alinhamento local e busca (*basic local alignment and search tool*)

BMGY: meio glicerol complexo tamponado (*buffered glycerol complex medium*)

BMM: meio mínimo tamponado (*buffered minimal medium*)

BMMY: meio metanol complexo tamponado (*buffered methanol complex medium*)

BSA: soro albumina bovina

cDNA: DNA complementar

CID: câmara de dissociação induzida por colisão (*collision induced dissociation*)

CRISP: proteína secretória rica em cisteína (*cysteine-rich secretory protein*)

DMC: dose mínima coagulante

DNA: ácido desoxirribonucleico

DTT: ditioneitol

ESI: ionização por *eletrospray* (*electrospray ionization*)

EST: sequências alvo expressas (*Expressed sequence tags*)

ETD: dissociação por transferência de elétrons (*electron-transfer dissociation*)

FA: ácido fórmico

FGDP: produtos de degradação do fibrinogênio

FL: fosfolipídios

FnDP: produtos de degradação da fibrina

FPA: fibrinopeptídeo A

FPB: fibrinopeptídeo B

FPLC: cromatografia líquida rápida de proteínas (*Fast Protein Liquid Chromatography*)

FT: fator tecidual

GlcNAc: N-acetilglicosamina

HCCA: ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência (*High performance liquid chromatography*)

IMAC: cromatografia de afinidade a metais imobilizados (*Immobilized-Metal Affinity Chromatography*)

Kex2: kexina 2

LAO: L- aminoácido oxidase

LB: meio de cultura Luria-Bertani

LIT: íon trap linear (*Linear ion trap*)

MALDI: ionização e dessorção a laser assistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption/ionization*)

TOF: tempo de voo (*time of flight*)

MM: meio mínimo não tamponado (*minimal medium*)

MS: espectrometria de massas (*mass spectrometry*)

NauAc: N-acetilneuramínico

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ORF: Fase aberta de leitura (*open reading frame*)

PAR: receptores ativados por proteinase (*proteinase activated receptors*)

PCR: Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

PITC: fenilisotiocianato

PLA₂: fosfolipases A₂

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

PpPDI: isomerase de pontes dissulfeto de *P. pastoris*

PTH: feniltioidantina

RP: cromatografia de fase reversa (*reverse phase*)

SD: desvio padrão (*standard deviation*)

SDS-PAGE: gel eletroforético de poli(acrilamida em dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*))

SVMP: metaloprotease de peçonha de serpente (*snake venom metalloproteinase*)

SVSP: serinoprotease de peçonhas de serpente (*snake venom serine proteinase*)

SVTLEs: enzimas semelhantes à trombina de peçonhas de serpente (*snake venoms trombin-simile enzymes*)

TAME: N- α -tosil-L-arginina metil éster

TCA: ácido tricloroacético

TPA: plasminogênio tecidual

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

UK: uroquinase

UV: ultravioleta

WHO: organização mundial da saúde (*World Health Organization*)

YNB: base nitrogenada de levedura (*Yeast Nitrogen Base*)

YPDS: meio contendo dextrose, peptona e extrato de levedura (*Yeast Extract Peptone Dextrose Medium*)

α MF: fator de acoplamento alfa (*α mating factor*)

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
1. Introdução.....	1
1.1. Acidentes ofídicos e soroterapia.....	2
1.2. Classificação, aspectos evolutivos e distribuição geográfica das serpentes do gênero <i>Crotalus</i>	5
1.3. A peçonha ofídica.....	7
1.4. Serinoprotease de peçonha de serpentes.....	11
1.5. SVSP e o sistema circulatório.....	14
1.6. Aplicações clínicas e biotecnológicas das enzimas trombina-simile.....	19
1.7. Expressão heteróloga de proteínas.....	21
2. Objetivos.....	24
2.1. Objetivos gerais.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3. Materiais e métodos.....	26
3.1. Peçonha.....	27
3.2. Sequenciamento de nucleotídeos da serinoprotease.....	27
3.3. Avaliação <i>in silico</i> da sequência de nucleotídeos da serinoprotease.....	27
3.4. Expressão heteróloga de proteínas.....	28
3.4.1. Construção do vetor para expressão da SVSP em <i>Pichia pastoris</i>	28
3.4.2. Transformação de células de <i>P. pastoris</i> e seleção de colônias recombinantes.....	29
3.4.3. Triagem em placa da expressão da proteína recombinante.....	29
3.4.4. Expressão de proteínas em larga escala.....	30

3.5. Purificação de proteínas.....	31
3.5.1. Purificação da serinoprotease recombinante.....	31
3.5.2. Purificação da serinoprotease nativa da peçonha bruta de <i>C. durissus collilineatus</i>	31
3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	32
3.7. Quantificação de proteínas.....	32
3.8. Caracterização estrutural.....	33
3.8.1. Determinação da massa molar.....	33
3.8.2. Sequenciamento amino-terminal.....	33
3.8.3. Sequenciamento de novo de peptídeos por MALDI-TOF/TOF.....	33
3.8.4. Sequenciamento de novo de peptídeos por ESI- <i>Ion Trap</i> quadrupolo.....	35
3.9. Caracterização enzimática e funcional.....	35
3.9.1. Atividade fibrinogenolítica.....	35
3.9.2. Identificação dos fibrinopeptídeos resultantes da clivagem do fibrinogênio.....	35
3.9.3. Determinação da dose mínima coagulante.....	36
3.9.4. Atividade proteolítica sobre substratos cromogênicos.....	36
3.9.5. Determinação dos parâmetros cinéticos.....	37
3.9.6. Estabilidade a diferentes condições de temperatura.....	38
3.9.7. Efeitos de íons divalentes sobre a atividade esterásica.....	38
3.10. Análise estatística dos resultados.....	38
4. Resultados e discussão.....	40
4.1. Sequenciamento de nucleotídeos e análise <i>in silico</i> da sequência da serinoprotease.....	40
4.2. Clonagem da serinoprotease a partir da biblioteca de cDNA da glândula de <i>C. durissus collilineatus</i>	41
4.3. Expressão heteróloga e purificação da rCollineina-1.....	43
4.3.1. Construção do vetor de expressão pPICZαA-Collineina1.....	43
4.3.2. Transformação das células de <i>P. pastoris</i>	48

4.3.3. Expressão e purificação da Collineina-1 recombinantes.....	51
4.4. Purificação da serinoprotease da peçonha de <i>C. durissus collilineatus</i>	59
4.5. Caracterização estrutural das serinoproteases nativas e recombinante.....	64
4.6. Caracterização enzimática e funcional comparativa da Collineina-1 na forma nativa e recombinante.....	70
4.6.1. Atividade fibrinogenolítica.....	70
4.6.2. Atividade coagulante sobre o plasma bovina.....	76
4.6.3. Avaliação sobre substratos cromogênicos.....	77
4.6.4. Estabilidade a diferentes condições de temperatura e influência de íons divalentes na atividade esterásica sobre o TAME.....	81
4.6.5. Ensaios de cinética enzimática.....	84
5. Considerações finais e perspectivas.....	87
5.1. Outras considerações.....	89
6. Referências Bibliográficas.....	91

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidentes ofídicos e soroterapia

Os acidentes ofídicos representam um problema de saúde pública mundial, em especial para os países tropicais e subtropicais situados na África, Ásia, Oceania e Américas (WHO, 2007; WILLIAMS et al., 2010; WARRELL, 2010; GUTIÉRREZ et al, 2010). As serpentes peçonhentas de importância médica são amplamente distribuídas por estes continentes e pertencem a quatro famílias: Elapidae, Viperidae, Atractaspidinae e Colubridae (WARRELL, 2012). De acordo com dados recentes da Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*), estima-se que ocorram no mundo cerca de 421 mil acidentes envolvendo serpentes peçonhentas anualmente, com aproximadamente 20.000 casos fatais. No entanto, estes números podem chegar a 2,5 milhões de casos e 85.000 mortes, pois a maioria dos envenenamentos ocorre em áreas remotas, dificultando assim o registro do número real de acidentes, o que impede a avaliação do verdadeiro impacto dos acidentes ofídicos em algumas partes do mundo (GUTIÉRREZ et al, 2010). A estimativa de distribuição global de ocorrência, mortalidade e morbidade de acidentes envolvendo serpentes peçonhentas é apresentada na figura 1.

Figura 1. Estimativas regionais da ocorrência de envenenamentos decorrentes de acidentes ofídicos no mundo. Adaptado de Gutiérrez e colaboradores (2010).

Em 2009, a WHO incluiu os acidentes causados por serpentes peçonhentas na lista de doenças tropicais negligenciadas (http://www.who.int/neglected_diseases/en/). Assim como o caso de outras doenças negligenciadas, os envenenamentos por serpentes têm recebido pouca atenção por parte das autoridades responsáveis. No entanto, esta iniciativa vem despertando o interesse de organizações de saúde pública e agências de pesquisa e desenvolvimento, com a finalidade de buscar e discutir soluções para esse complexo problema de saúde e gerar recursos para o controle dos problemas globais decorrentes desse tipo de envenenamento (GUTIÉRREZ et al., 2010).

Os esforços coletivos e individuais para a formulação de novas abordagens para a redução dos impactos desses acidentes levou a criação da iniciativa global de acidentes ofídicos (<http://www.snakebiteinitiative.org/>) na Conferência de Assuntos Globais em Toxinologia Clínica, realizada em Melbourne (Austrália) em 2008. A iniciativa foi apresentada pelo Prof. Dr. David Warrell, seu idealizador, no Congresso Mundial da Sociedade Internacional de Toxinologia (IST - *International Society of Toxinology*), realizado em Recife (Brasil) em 2009, e recebeu de imediato o apoio oficial desta organização. Com essa iniciativa, um grupo interdisciplinar foi formado para estabelecer uma política de saúde pública e elaborar medidas práticas e específicas para cada país ou região para minimizar os danos econômicos e sociais causados por envenenamentos por serpentes (WILLIAMS et al., 2010).

Segundo dados do Ministério da Saúde, no Brasil foram registrados 312.853 casos de acidentes ofídicos no período de 2000 a 2011, com índice de letalidade de 0,42%. A maioria desses acidentes deve-se a serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*, sendo raros os causados por *Lachesis* e *Micrurus* (PINHO & PEREIRA, 2001). Os acidentes responsáveis pelo maior número de casos fatais são os relacionados a serpentes do gênero *Crotalus*, seguido pelos acidentes com serpentes do gênero *Lachesis*, *Micrurus* e *Bothrops*, respectivamente. A maioria dos acidentes é registrada nas regiões Sudeste e Sul, que são locais que contam com eficiente sistema de saúde e de informação. Acredita-se que haja subnotificações nas regiões Norte e Nordeste, tendo em vista as dificuldades de acesso ao serviço de saúde (CARDOSO, 2003).

A epidemiologia dos acidentes ofídicos aponta para um perfil de vítimas preferencialmente do sexo masculino, trabalhadores rurais, na faixa etária de 15 a 49 anos, atingindo principalmente os membros inferiores. Os acidentes também apresentam sazonalidade marcante, ocorrendo com maior frequência nos meses quentes e com maior

incidência de chuva (BOCHNER & STRUCHINER, 2003). Por se tratar de um problema que afeta principalmente populações rurais, o acesso restrito aos serviços de saúde e a escassez de soros antiofídicos nestas regiões levam a um aumento considerável na mortalidade causada por este tipo de acidente. Mesmo nos casos em que a vítima sobrevive, a ausência de tratamento adequado pode levar a sequelas físicas e psicológicas permanentes. Além disso, diante do fato de que a maioria das vítimas são pessoas jovens e em idade produtiva, os acidentes ofídicos podem causar impactos consideráveis na economia, sendo assim considerada uma doença de caráter ocupacional (KASTURIRATNE et al., 2008; WARRELL, 2010).

No Brasil, os acidentes ofídicos representam um problema de saúde pública desde o período colonial. Nessa época os acidentes causados por serpentes eram considerados uma das grandes pragas existentes, sendo responsáveis por um número significativo de óbitos. Somente no final do século XIX, o desenvolvimento da Microbiologia e da Imunologia impulsionou pesquisas que culminaram com o desenvolvimento de soros hiperimunes, resultando em uma diminuição da mortalidade e morbidade causada por este tipo de acidente.

O desenvolvimento do primeiro soro antiofídico brasileiro se deu com a criação do Instituto Soroterápico do Estado de São Paulo em 1901, atual Instituto Butantan. Pela primeira vez, Vital Brazil demonstrou que os soros produzidos contra cascavéis e jararacas apresentavam propriedades distintas, e o efeito destes era dependente da compatibilidade entre o gênero da serpente utilizada na imunização do animal e o gênero responsável pelo acidente, comprovando assim a especificidade dos soros antiofídicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Ainda hoje, o tratamento mais eficaz para os acidentes ofídicos consiste na administração intravenosa de anticorpos produzidos através da hiperimunização de animais, principalmente cavalos, usando como antígeno a peçonha bruta. Os soros antiofídicos atuais são compostos por imunoglobulinas purificadas ou fragmentos de anticorpos originados por digestão por pepsina [F(ab')₂ divalentes] ou papaína (Fab monovalentes) (ESPINO-SOLIS et al., 2009).

Quando a soroterapia de acidentes ofídicos começou a ser empregada no tratamento de envenenamentos por serpentes, a seleção das serpentes utilizadas nas imunizações era baseada somente no perfil tóxico da peçonha e em aspectos taxonômicos gerais, sem considerar as características bioquímicas e imunoquímicas das toxinas envolvidas no envenenamento. Porém, mesmo após mais de um século de investigações, o protocolo de imunização quase não mudou, e apesar de os soros antiofídicos atuais apresentarem eficácia e segurança

aprimorada em relação aos primeiros soros fabricados, muitas questões ainda precisam ser abordadas para aperfeiçoar o desenvolvimento e fabricação dos antivenenos. Essas questões demandam esforços por parte de pesquisadores e agências de desenvolvimento em transformar os conhecimentos obtidos em domínios tecnológicos que permitam a produção de soros antiofídicos que atendam aos seguintes parâmetros de qualidade: eficácia, segurança, disponibilidade e custo (GUTIÉRREZ et al., 2011).

1.2. Classificação, aspectos evolutivos e distribuição geográfica das serpentes do gênero *Crotalus*

A Família Viperidae apresenta o mais sofisticado sistema de inoculação de peçonha dentre os grupos de serpentes existentes, que é caracterizado por uma glândula pós-orbital, associada a longas presas retráteis e tubulares localizadas na porção frontal do maxilar, pela qual a peçonha é injetada por compressão de músculos acessórios à glândula (JACKSON, 2007; VONK et al., 2008; FRY et al., 2008). As serpentes desta família são subdivididas em quatro principais clados: Azemiops, Causus, Viperinae e Crotalinae. A subfamília Crotalinae é considerada o grupo mais amplamente disseminado devido a sua vasta distribuição pelo Velho e Novo Mundo (McDIARMID et al., 1999; CAMPBELL & LAMAR, 2004).

As serpentes da subfamília Crotalinae são diferenciadas das outras serpentes pertencentes à família Viperidae pela presença de um órgão termorreceptor, denominado fosseta loreal, localizado entre os olhos e as narinas em cada lado da cabeça, o qual detecta pequenas flutuações de radiação termal emitida, permitindo a detecção da presença e direção de presas endotérmicas (BULLOCK & COWLES, 1952; BAKKEN & KROCHMAL, 2007).

Acredita-se que as serpentes Crotalinae tiveram origem asiática e colonizaram o Novo Mundo por uma única e recente invasão pela América do Norte, provavelmente durante o final do período Oligoceno e início do Mioceno, seguida de uma rápida radiação adaptativa pela América Central e do Sul (PARKINSON et al., 1999; 2002, WÜSTER et al., 2002; 2008), dando origem aos vinte gêneros dessa subfamília conhecidos atualmente no Continente Americano (CAMPBELL & LAMAR, 2004).

As cascavéis são serpentes pertencentes à subfamília Crotalinae, e por quase dois séculos foram classificadas em dois gêneros: *Sistrurus* e *Crotalus*. Recentemente, Hoser (2009) publicou uma reclassificação das cascavéis, a qual inclui o ressurgimento de três gêneros previamente descritos: *Caudisona*, *Aechmophryus* e *Uropsophus*, além da descrição de quatro novos gêneros e sete novos subgêneros. No entanto, a reclassificação das cascavéis

proposta por Hoser (2009) foi contestada por Wüster e Bérnils (2011), que alegaram que os conhecimentos filogenéticos atuais são insuficientes para justificar uma mudança na taxonomia destas serpentes. Além disso, diversas análises confirmam a característica monofilética deste grupo (PARKINSON, 1999; MURPHY et al., 2002), não havendo bases filogenéticas consistentes para a divisão dos gêneros *Crotalus* e *Sistrurus*. A contestação da reclassificação foi aceita pela Sociedade Brasileira de Herpetologia e motivou a adoção da classificação antiga das cascavéis pela comunidade científica, de forma a evitar problemas adicionais decorrentes da instabilidade da nomenclatura.

Os gêneros *Crotalus* e *Sistrurus* foram originados à aproximadamente 20 milhões de anos no período médio Cenozóico (KNIGHT et al., 1993). A região precisa da origem das cascavéis permanece indefinida, no entanto alguns autores sugerem que a provável área ancestral dessas serpentes é a Serra Madre Ocidental, localizada do *Plateau* Mexicano (GLOYD, 1940, PLACE & ABRANSON, 2004), com a subsequente dispersão em direção a América do Norte e do Sul, depois de divergirem de seu ancestral comum, juntamente com o gênero *Agkistrodon* (GREENE, 1997; PARKINSON, 1999; 2002; PLACE & ABRANSON, 2004). A característica mais peculiar das cascavéis consiste na presença de um “guizo” ou “chocalho” na porção final da cauda, formado pela sobreposição de grupos de anéis de queratina que vibram quando a serpente é ameaçada, produzindo som de alerta (KLAUBER, 1997).

O gênero *Crotalus* compreende aproximadamente 34 espécies de serpentes (<http://www.reptile-database.org/>) distribuídas desde o Canadá até o Norte da Argentina (CAMPBELL & LAMAR, 2004), sendo representado no Brasil por uma única espécie, *Crotalus durissus* (OSHIMA-FRANCO et al., 1999; CARDOSO, 2003). São reconhecidas sete variantes geográficas desta espécie de serpente no Brasil, três das quais são amplamente distribuídas pelo território brasileiro: *Crotalus durissus cascavella*, habitando áreas de caatinga no nordeste brasileiro, *Crotalus durissus collilineatus*, sendo encontradas principalmente nas formações de cerrado do Centro-Oeste e Sudeste e *Crotalus durissus terrificus*, que habitam campos abertos e áreas cultivadas do sudeste e sul do país (CARDOSO, 2003). Apesar das serpentes do complexo *Crotalus durissus* serem atualmente separadas em subespécies distintas, *C. d. cascavella* e *C. d. collilineatus* têm sido consideradas por alguns autores sinônimo de *C. d. terrificus* (SANTORO et al., 1999; WÜSTER et al., 2005; BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010).

A espécie *C. durissus* divergiu de todas as outras cascavéis há aproximadamente 13 milhões de anos (QUIJADA-MASCARENHAS & WÜSTER, 2006; HOSER, 2009) e hoje apresenta a mais extensa distribuição, abrangendo áreas desde o México até o Norte da Argentina. Estas serpentes habitam formações secas, sendo ausentes em florestas tropicais, com exceção de algumas áreas abertas dentro da floresta amazônica (CAMPBELL & LAMAR, 1989; 2004; WÜSTER et al., 2005).

A dispersão da espécie *C. durissus* pelas Américas Central e do Sul foi traçada por Wüster e colaboradores (2005). O cenário biogeográfico desta espécie de serpente, combinado com análises cladogênicas, sugerem uma invasão progressiva do México ao Norte da América do Sul através da floresta amazônica durante uma suposta fragmentação desta floresta tropical no início do período Pleistoceno, que resultou na abertura de corredores de savana pelos quais as cascavéis colonizaram a América do Sul. Após o fechamento desses corredores, ocorreu um processo de vicariância da espécie, seguido de uma irradiação adaptativa relativamente recente em direção ao sul, o que reflete na pouca divergência observada entre as cascavéis existentes no território sul-americano.

1.3. A peçonha ofídica

A evolução das glândulas de peçonha nas serpentes levou ao aparecimento de substâncias biologicamente ativas que, desde o início, conferiram vantagens a esses animais na captura de presas de grande porte, que provavelmente eram subjugadas por processos mecânicos antes do aparecimento deste aparato. As primeiras substâncias ativas eram provavelmente enzimas com propriedades digestivas, que tinham a função de enfraquecer a presa, tornando a captura mais fácil e segura (KOCHVA, 1986). Atualmente, a peçonha de serpentes apresenta múltiplas funções, como imobilizar, matar e digerir a presa (GUTIÉRREZ et al., 2009; CALVETE et al., 2009).

A peçonha consiste em uma complexa mistura de proteínas, peptídeos, lipídios, polissacarídeos e substâncias químicas inorgânicas. Polipeptídeos e proteínas estão presentes em maiores proporções, chegando a compor de 90-95% do seu peso seco. As toxinas presentes nas peçonhas de serpentes pertencem a diferentes classes de proteínas, incluindo enzimas [fosfolipases A₂ (PLA₂), metaloproteases (SVMP – *snake venom metalloproteinase*), L-aminoácido oxidases (LAO), serinoproteases] e proteínas sem atividades enzimáticas [desintegrinas, peptídeos natriuréticos, fatores de crescimento, miotoxinas, lectinas tipo-C e proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISP – *cysteine rich secretory protein*)]. Essa

combinação confere um arranjo eficiente de propriedades tóxicas ao veneno, capaz de desencadear severas desordens metabólicas na presa. Dentre estes efeitos, pode-se destacar neurotoxicidade, cardiotoxicidade, edematogenicidade, miotoxicidade, ações coagulantes, hemostáticas, hemorrágicas, nefrotóxicas e hepatotóxicas (CHIPPAUX et al., 1991; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995; MARKLAND, 1998a).

Na tabela 1 são apresentadas as principais classes de toxinas previamente identificadas e caracterizadas da peçonha de diferentes famílias de serpentes, assim como seus efeitos metabólicos conhecidos até o momento. Tal diversidade na composição e ações fisiopatológicas das peçonhas deve-se a um processo evolutivo no qual um gene codificante para uma proteína com função fisiológica normal é duplicado, com subsequente expressão de uma das cópias em um tecido específico. Além da duplicação gênica, uma diversificação é gerada por meio de mutações ao acaso, conversão gênica e *crossing over* desigual (FRY et al., 2003; FRY, 2005; FRY et al., 2009).

A ampla distribuição geográfica das serpentes do gênero *Crotalus* resultou em grandes variações inter e intraespecíficas na composição da peçonha e nos seus efeitos fisiopatológicos. Contudo, esta variabilidade pode estar também relacionada a fatores ontogenéticos, sazonais, inter e intrapopulacionais e individuais (CHIPPAUX et al., 1991; CASEWELL et al., 2013).

A peçonha das cascavéis sul-americanas é predominantemente composta pela crotoxina (até 60% do peso seco) (PONSE-SOTO et al., 2002), sendo essa a principal responsável pela intensa neurotoxicidade (HOWGOOD, 1990) e nefrotoxicidade (MARTINS et al., 2002; AMORA, et al., 2006) característica dos acidentes crotálicos. Em contraste, a peçonha de serpentes do gênero *Crotalus* da América Central apresentam altas concentrações de metaloproteases e baixa toxicidade (MACKESSY, 2008), sendo que a crotoxina está presente em uma baixa concentração relativa (GUTIÉRREZ et al., 1991). Esses dados revelam uma tendência no aumento da concentração de neurotoxinas ao longo do eixo Norte-Sul, correspondente à rota de dispersão das cascavéis na América do Sul (CALVETE et al., 2010). Ademais, uma variação ontogenética é observada em relação ao perfil de toxinas das peçonhas de *Crotalus* adultas e neonatas da Costa Rica. A peçonha de serpentes juvenis é similar à das cascavéis adultas da América do Sul, o que sugere um processo de pedomorfismo nas serpentes sul-americanas, provavelmente adquirido durante a dispersão das serpentes do gênero *Crotalus* pela floresta amazônica (LOMONTE et al., 1983; GUTIÉRREZ et al., 1991; SARAIVIA et al., 2002; CALVETE et al., 2010).

TABELA 1 - Famílias de toxinas de peçonha de serpentes de importância clínica e científica. Tabela adaptada de Warrel (2010).

Classe de toxina	Exemplos de toxinas	Serpentes	Funções
Toxinas de três dígitos (three-finger toxins)	α -bungarotoxinas	<i>Bungarus</i> spp e outras serpentes das famílias Elapidae e Colubridae	Paralisia e bloqueio de receptores para nicotina e acetilcolina
Peptídeos potencializadores de bradicinina e inibidores da enzima conversora de angiotensina	--	Viperidae	Hipotensão
Acetilcolinesterase	--	Elapidae	Paralisia pela degradação da acetilcolina
Desintegrinas e metaloproteases	Hemorraginas (atrolisinas, jararagina); enzimas pró-coagulantes (fibrolase, ecarina)	Viperidae, Elapidae	Dano endotelial, hemorragia e necrose
Proteínas ricas em cisteínas	Toxina intestinal de mamba (procineticina)	<i>Dendroaspis polylepis</i>	Hiperalgisia, espasmos intestinais dolorosos, efeitos sobre o sistema nervoso central
Fator do complemento C3 de peçonha de cobra	Fator de peçonha de cobra	Viperidae, Elapidae	Dano tecidual
Lectinas tipo-C	Rhodocetina	<i>Calloselasma rhodostoma</i> e outras serpentes da família Viperidae e Elapidae	Efeito sobre as plaquetas
Pequenas miotoxinas básicas	Crotamina e Crotasina	<i>Crotalus durissus</i> ssp.	Necrose muscular e espasmos
Proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs)	--	Viperidae, Elapidae e Colubridae	Inibição de músculo liso
Inibidores de cisteíno-Proteases	Cistatina	Viperidae, Elapidae	Inibidores de metaloproteases
Endotelinas	Sarafotoxinas	<i>Atractaspis</i> spp	Hipertensão, efeitos sobre o miocárdio
Ativadores de fator X e fator V	--	Viperidae e Elapidae australianas	Coagulopatias
Serinoproteases	--	Viperidae, Elapidae e Colubridae	Hipotensão e efeitos sobre a coagulação sanguínea
Inibidores de proteases semelhantes ao domínio kunitz	Dendrotoxinas	<i>Dendroaspis</i> spp e outras serpentes da família Elapidae	Bloqueio neuromuscular por despolarização e inibição de serinoproteases circulatórias
L-amino ácido oxidases	--	Todas	Apoptose
Peptídeos natriuréticos	--	Elapidae: peptídeos atriais e cerebrais, Viperidae: Peptídeos natriuréticos tipo-C	Hipotensão
Fatores de crescimento neural	--	Maioria das serpentes peçonhentas	Não-determinada
Fosfolipases A ₂	β bungarotoxinas	Maioria das serpentes peçonhentas	Paralisia por bloqueio pré-sináptico, destruição do terminal nervoso, miotoxicidade
Fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF)	Fator hipotensivo potente homólogo a VEGF	Viperidae	Dano endotelial, permeabilidade, edema e hipotensão

A crotoxina pertence à classe das β -neurotoxinas e compreende duas subunidades polipeptídicas ligadas não-covalentemente: uma fosfolipase A_2 básica e tóxica, denominada crotoxina B, e um componente ácido, não tóxico e desprovido de atividade enzimática, denominado crotapotina ou crotoxina A. A crotapotina, quando associada à fosfolipase A_2 do complexo crotoxina, aumenta em cerca de 10 vezes a letalidade desta toxina, ao mesmo tempo em que inibe sua atividade enzimática (CHANG & SU, 1981; RADVANYI et al., 1989). Os mecanismos pelos quais a crotapotina inibe a atividade fosfolipásica do componente B da crotoxina ainda não foram completamente elucidados, porém, sabe-se que a subunidade ácida possui função de chaperona, assegurando o endereçamento da fosfolipase A_2 básica à junção pré-sináptica por prevenir ligações inespecíficas desta enzima. Assim como outras β -neurotoxinas, a crotoxina age no botão pré-sináptico, bloqueando a transmissão neuromuscular por inibir a liberação de acetilcolina (BON et al., 1989; CHOUMET, et al., 1993).

Na peçonha de serpentes *C. durissus* são encontradas também outras neurotoxinas, como a crotamina e a giroxina. A crotamina é uma toxina básica que apresenta conformação de β -defensina e é capaz de gerar espasmos e paralisia nas patas traseiras de camundongos (KERKIS et al., 2004). Estudos farmacológicos demonstraram que a crotamina induz a despolarização de células de músculo esquelético e o influxo de íons Na^+ , provavelmente por agir diretamente nos canais de Na^+ da membrana plasmática destas células (OGUIURA et al., 2005). Outras ações farmacológicas relacionadas a esta toxina incluem o aumento da liberação basal de acetilcolina e dopamina no tecido estriado de ratos (CAMILLO et al., 2001) e o aumento da secreção de insulina nas ilhotas pancreáticas (TOYAMA et al., 2000).

Já a giroxina é uma enzima multifuncional pertencente à classe das serinoproteases trombina-simile. Essa toxina, quando injetada em camundongos por via intravenosa ou intracerebroventricular, é capaz de provocar episódios temporários de rotação do animal ao redor de seu eixo longitudinal (ALEXANDER et al., 1988). Este efeito é denominado “síndrome da giroxina” ou “rotação em barril” e foi primeiramente descrito por Barrio (1961). Porém, somente em 1975 Cohn & Cohn introduziram este conceito na neurociência. Algumas SVSPs da família Viperidae, além de determinados peptídeos como arginina-vasopressina (KRUSE et al., 1977) e endotelina-3 (KANNAN et al., 1994), também são capazes de induzir este efeito. O mecanismo pelo qual a giroxina induz esta síndrome neurológica ainda não foi completamente esclarecido, porém, estudos recentes indicam que a ação desta enzima no

sistema nervoso central pode estar relacionada às suas ações sobre a membrana basal e endotélio vascular (SILVA et al., 2012).

Há ainda diversos outros componentes ativos previamente identificados na peçonha de serpentes do gênero *Crotalus*, como desintegrinas (SHIMOKAWA et al., 1997, 1998; SÁNCHEZ et al., 2006), peptídeos potencializadores de bradicinina (HIGUCHI et al., 2006; GOMES et al., 2007); peptídeos natriuréticos (EVANGELISTA et al., 2008), metaloproteases (TU et al., 1996; CHEN & RAEL, 1997; KOMORI et al., 2011; WU et al., 2001), proteínas semelhantes à lectinas tipo-C (FRANCISCHETTI et al., 1997; TOYAMA et al., 2001; HAMAKO et al., 2007) e L-aminoácido oxidases (WELLNWE & MEISTER 1960; TORII et al., 1997; TOYAMA et al., 2006; VARGAS et al., 2012). Estes componentes, no entanto, são pouco estudados para as serpentes crotálicas sul-americanas por estarem presentes na peçonha em menores proporções em relação às toxinas predominantes.

1.4. Serinoproteases de peçonhas de serpentes

As proteases estão presentes na peçonha da maioria das famílias de serpentes e são estruturalmente classificadas em metaloproteases e serinoproteases. As proteases de peçonhas de serpentes são as principais responsáveis pela lesão tecidual no local da picada, além de promoverem a clivagem de proteínas plasmáticas da vítima. As serinoproteases (SVSPs) atuam principalmente sobre proteínas plasmáticas, gerando uma diversidade de alterações fisiológicas com efeitos sobre a agregação plaquetária, coagulação sanguínea, fibrinólise, pressão sanguínea, sistema complemento e sistema nervoso (TU, 1996; OUYANG et al., 1990; MARKLAND, 1991, 1998a, b; PIRKLE, 1990, 1998).

As SVSPs foram possivelmente originadas de caliceínas presentes em glândulas submaxilares, a partir das quais as glândulas de peçonhas provavelmente evoluíram. As funções das serinoproteases diversificaram durante o processo evolutivo, sem alterar, no entanto, as principais características estruturais destas enzimas (DESHIMARU et al., 1996). As estruturas primárias das SVSPs, quando comparadas com as estruturas da quimotripsina, tripsina, trombina e caliceína, apresentam um alto grau de conservação de cinco pontes dissulfeto e do domínio catalítico, que contém a tríade formada por His57, Asp102 e Ser195. A catálise da ligação peptídica promovida pelas SVSPs ocorre por meio de uma reação de acilação e desacilação, na qual a serina tem ação nucleofílica e o resíduo de histidina atua como doador/aceptor de prótons (POLGÁR, 1971). As propriedades enzimáticas das SVSPs são suscetíveis a uma diversidade de inibidores sintéticos e naturais (MATSUI et al., 2000),

principalmente àqueles que modificam a serina reativa, como o PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), que forma uma ligação covalente com este resíduo do sítio catalítico (JIANG et al., 2011).

A diversidade funcional das serinoproteases de peçonha de serpente é resultado de um processo evolutivo caracterizado por duplicação gênica, mutações pontuais ao acaso e permutação de segmentos exônicos (MACKESSY, 2010). As mutações pontuais dificilmente geram alterações conformacionais ou funcionais significativas, mas em alguns casos podem ter um efeito deletério sobre a molécula. Desta forma, o material gênico tende a manter-se estático de forma a conservar a estrutura e função originais da proteína codificada. No entanto, quando um gene é duplicado, a cópia gênica fica livre de pressões seletivas e as mutações pontuais se acumulam, podendo levar à neofuncionalidade da molécula. Repetidas duplicações gênicas seguidas de mutações pontuais podem levar ao surgimento de famílias multigênicas, que codificam uma série de proteínas estruturalmente relacionadas, apresentando distintas ações farmacológicas (OGAWA et al., 1996; NOBUHISA et al., 1996; KINI & CHAN, 1999). No caso das SVSPs, as substituições não conservativas ocorrem em uma taxa muito maior nas regiões codificantes em relação às regiões que não codificam a proteína (DESHIMARU et al., 1996). Além disso, rearranjos gênicos ocorrem com alta frequência, principalmente nas regiões relacionadas à ligação ao substrato, gerando assim alterações de forma mais rápida e expressiva na especificidade ao substrato das SVSPs (DOLEY et al., 2009).

Os genes que codificam as SVSPs pertencem à família de genes tripsina/caliceína, que compreende cinco éxons e quatro íntrons, sendo que a proteína madura é codificada pelos éxons 2 a 5 (ITOH et al., 1988a, b; WANG et al., 2001). As SVSPs são sintetizadas na forma de um zimogênio de cerca de 260 aminoácidos, contendo um peptídeo sinal e um pró-peptídeo de 18 e 6 resíduos de aminoácidos, respectivamente. As SVSPs na forma madura são, geralmente, moléculas de cadeia única apresentando seis pontes dissulfeto, com exceção da toxina RP-34 de *Cerastes cerastes*, que apresenta um resíduo de cisteína despareado, responsável pela formação de um homodímero (LARABA-DJEBARI et al., 1992) e da brevinase de *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*, que consiste em um heterodímero (LEE et al., 1999).

Muitas SVSPs são glicoproteínas, apresentando até 30% da molécula em conteúdo de carboidratos, o que resulta em uma variação de 23 a 67 kDa na massa molar destas enzimas. Os sítios de glicosilação podem estar presentes nas SVSPs em posições não homólogas, sendo

que a importância do conteúdo de carboidratos na relação estrutura-função destas moléculas não foi, até o momento, determinada (CASTRO et al., 2004; SAJEVIC et al., 2011).

A conformação estrutural das SVSPs é semelhante à das tripsinas, a qual é composta por duas estruturas em formato de barril, formadas por seis folhas β -pregueadas cada. A cavidade do sítio ativo está localizada na junção destas duas estruturas, sendo que a entrada deste sítio é restringida por diversas alças. Acredita-se que as propriedades de cada uma das alças que envolvem a entrada do sítio ativo seja um fator determinante na especificidade ao substrato. A estrutura tridimensional das SVSPs é estabilizada por seis pontes dissulfeto, das quais cinco apresentam um padrão altamente conservado entre todas as serinoproteases. A sexta ponte dissulfeto, no entanto, é característica das SVSPs e é responsável por conectar a extensão C-terminal destas moléculas à alça 99 (Cys91 – Cys245) (PARRY et al., 1998; SERRANO & MAROUN, 2005). A análise do modelo tridimensional da enzima rCC-PPP de *Cerastes cerastes* revelou que a alça 99 (Phe90 – Val99), juntamente com os resíduos Tyr172 e Trp215, formam uma estrutura altamente hidrofóbica, similar à da trombina, que está envolvida na interação com o fibrinogênio (DEKHIL et al., 2003).

Grande parte das SVSPs estudadas até o momento pertence a peçonhas de serpentes da família Viperidae. Algumas serinoproteases presentes em peçonhas de serpentes do gênero *Crotalus* foram previamente isoladas e caracterizadas e são apresentadas na tabela 2. Dentre as cascavéis sul-americanas, a peçonha de *C. d. terrificus* é a mais estudada em relação a esta classe de proteínas. No entanto, não existem muitos dados na literatura referentes às serinoproteases das outras subespécies brasileiras do gênero *Crotalus*.

TABELA 2 - Serinoproteases isoladas e caracterizadas da peçonha de serpentes do gênero *Crotalus*

Espécie	Nome	Massa molar aproximada	pI	Atividade sobre o fibrinogênio	Referências
<i>C. d. terrificus</i>	Giroxina	30 kDa	5,5	clivagem das cadeias A α e B β	BARROS et al., 2011
	Giroxina-simile B2.1	32 kDa	--	clivagem da cadeia A α	ALEXANDER et al., 1988
	CdtII-2	30 kDa	--	clivagem da cadeia B β	OLIVEIRA et al., 2009
	--	34 kDa	--	clivagem da cadeia A α	RAW et al., 1986
<i>C. d. collilineatus</i>	CdcII-3	30 kDa	--	clivagem da cadeia B β	OLIVEIRA et al., 2009
<i>C. d. cascavella</i>	--	28 kDa	--	clivagem das cadeias A α e B β	FONSECA et al., 2006
<i>C. adamanteus</i>	Crotalase	32,7 kDa	--	clivagem da cadeia A α	MARKLAND & DOMUS, 1971; MARKLAND et al., 1982
<i>C. atrox</i>	Catroxase	24 kDa	--	clivagem das cadeias A α e B β	CHIOU et al., 1992
		22,9 kDa	4,65	clivagem da cadeia B β	SAPRU et al., 1983
<i>C. horridus horridus</i>	--	29,5 kDa	--	clivagem da cadeia A α	SHU et al., 1983
<i>C. d. cumanensis</i>	Cdc SI	28,561 kDa	--	clivagem da cadeia A α	PATÍÑO et al., 2013
	Cdc SII	28,799 kDa	--	clivagem da cadeia A α	PATÍÑO et al., 2013

1.5. SVSPs e o sistema circulatório

A circulação sanguínea desempenha um papel crucial no transporte de gases, nutrientes e produtos residuais, além de exercer importante função na defesa dos vertebrados contra agentes patogênicos. O sistema circulatório é estritamente regulado de forma a prevenir a perda sanguínea ou bloqueios da circulação pela formação de trombos e embolia, uma vez que qualquer distúrbio nesse sistema pode levar a complicações que podem culminar em debilidade ou morte (KINI, 2011). A hemostasia é definida como um conjunto de complexos processos fisiológicos envolvidos na modulação do sistema circulatório. Essa regulação é

realizada em três passos principais: (i) vasoconstrição, que resulta na redução do fluxo sanguíneo para o local lesionado; (ii) ativação de plaquetas e fatores da coagulação, que levam à formação de trombos e impedem o extravasamento sanguíneo; e (iii) fibrinólise, que remove o coágulo sanguíneo, reestabelecendo a circulação local.

A remoção do endotélio vascular por injúria ou outro mecanismo expõe as plaquetas do sangue ao contato com macromoléculas da região subendotelial, especialmente o colágeno, que se tornam ativadas e liberam o conteúdo dos grânulos citoplasmáticos (ADP, tromboxase A_2 e serotonina). O ADP é responsável pela ativação de outras plaquetas, que vão se agregar umas às outras compondo um tampão plaquetário, que servirá de superfície para a formação do coágulo sanguíneo. A coagulação sanguínea é iniciada pela ativação dos fatores da coagulação que levam à conversão do fibrinogênio em fibrina, resultando na formação de um coágulo resistente e insolúvel (SAJEVIC et al., 2011).

O modelo clássico da "cascata de coagulação sanguínea" foi proposto em 1964, por McFarlane e Davie, no qual sugeriram que a fisiologia da coagulação do sangue era caracterizada por uma ativação proteolítica sequencial de pró-enzimas por proteases do plasma. O modelo da cascata de coagulação sanguínea representou um avanço científico importante no entendimento do processo de formação dos coágulos. No entanto, recentes observações clínicas e experimentais demonstram que a hipótese da cascata não explica completamente os eventos da hemostasia *in vivo*.

Diante disso, Hoffman e Monroe (2001) propuseram um modelo baseado em superfícies celulares, que enfatiza a interação dos fatores da coagulação com superfícies de células específicas, explicando muitas das questões até o momento não entendidas. Este modelo é baseado em três passos: iniciação, amplificação e propagação, e requer a participação de dois grupos celulares: plaquetas e células que expressam fator tecidual (FT) em sua superfície. A coagulação sanguínea é iniciada com a ativação do fator VII (FVII) plasmático, mediada pelo contato desse com o FT de células localizadas fora da vasculatura. O complexo FVIIa/FT ativa os fatores IX e X, seguido pela associação do fator X ativado (FXa) ao fator V, formando assim o complexo protrombinase na superfície das células que expressam FT. O complexo protrombinase é translocado para a superfície de plaquetas e promove a conversão de protrombina em trombina. Na fase de amplificação, a trombina gerada induz a ativação plaquetária que, por sua vez, expõe seus receptores de superfície e sítios de ligação para os fatores ativados da coagulação sanguínea. A trombina formada na superfície de plaquetas também ativa os fatores XI, V e VIII. Esse último, quando ativado, se

dissocia do fator de von Willebrand, realizando uma mediação adicional de adesão e recrutamento plaquetário no local da lesão vascular, e dá início à fase de propagação. Por fim, a trombina cliva o fibrinogênio em fibrina e ativa o fator XIII, que é responsável pela formação das ligações cruzadas entre os monômeros de fibrina, conferindo resistência ao coágulo formado. A coagulação sanguínea pode ser regulada negativamente pela ação de diversos fatores, como antitrombina III, que inibe a trombina e os fatores IXa, Xa e XIa, proteínas C e S que inativam os fatores Va e VIIIa, e inibidores via FT que inibem FXa livre e o complexo FT/FVIIa/FXa.

Além da coagulação sanguínea, outro importante componente da hemostasia é o sistema fibrinolítico, que é responsável pela remoção de coágulos do sistema circulatório. A fibrinólise é mediada pela ação de enzimas que degradam a fibrina dos coágulos formados, como a plasmina, que é formada pela ativação do plasminogênio por serinoproteases endógenas, ativadores de plasminogênio tecidual (TPA) e uroquinase (UK) (SAJEVIC et al., 2011).

Diversos animais peçonhentos e venenosos produzem toxinas que têm como alvo fatores do sistema hemostático. As peçonhas de serpentes apresentam uma variedade de proteínas e peptídeos, como fosfolipases A₂, metaloproteases, L-aminoácido oxidases, serinoproteases, lectinas tipo-C, 5'-nucleotidases e desintegrinas, que agem sobre pontos específicos do sistema sanguíneo, resultando em distúrbios hemostáticos que facilitam a captura da presa. Na figura 2, são representados os passos da coagulação sanguínea e sistema fibrinolítico, indicando os pontos nos quais atuam as principais toxinas hemostaticamente ativas de peçonhas de serpentes.

As serinoproteases são amplamente encontradas nas peçonhas de serpentes das famílias Viperidae e Crotalidae, podendo chegar a compor cerca de 20% do total de proteínas da peçonha. Estas toxinas interferem em uma diversidade de pontos da coagulação sanguínea, podendo agir de forma inespecífica por ação proteolítica, ou de forma seletiva ativando ou inativando fatores específicos envolvidos na agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise (BRAUD et al., 2000a). A classe de serinoproteases prevalente nas peçonhas da família Viperidae é a das enzimas trombina-simile ou SVTLEs (*Snake venom thrombin-like serine proteinases*), que apresentam ação similar à da trombina humana, promovendo a coagulação sanguínea *in vitro*. No entanto, as enzimas trombina-simile tornam o sangue incoagulável *in vivo* por clivarem o fibrinogênio, sem promoverem a ativação do fator XIII da coagulação, responsável pela formação de ligações cruzadas entre os monômeros de fibrina. Desta forma,

somente o coágulo “frouxo” é formado, o qual pode ser facilmente degradado pelo sistema fibrinolítico, depletando assim os níveis de fibrinogênio plasmático. (HUTTON & WARREL, 1993; SERRANO & MAROUM, 2005; KINI, 2006). Além disso, as serinoproteases podem apresentar efeito sinérgico com outras toxinas, levando a um agravamento do efeito hemorrágico causado pelas metaloproteases de peçonha.

Figura 2. Toxinas de peçonha de serpentes que agem sobre a coagulação sanguínea. Proteinases interferem por ação proteolítica sobre fatores específicos (setas grossas), enquanto outros fatores interferem se ligando a esses fatores (blocos vermelhos). Caixas verdes: enzimas pro-coagulantes; caixas vermelhas: enzimas anticoagulantes ou que afetam a fibrinólise; caixas azuis: PLA₂s; caixas amarelas: proteínas sem ação enzimática, FT: fatores teciduais; FL: fosfolipídios; APC: ativadores de proteína C; UK: uroquinases; TPA: ativadores de plasminogênio tecidual; FGDP: produtos de degradação do fibrinogênio; FnDP: produtos de degradação da fibrina. Adaptado de Kini (2011).

As enzimas trombina-simile podem clivar a cadeia A α ou a cadeia B β do fibrinogênio, liberando os fibrinopeptídeos A (FPA) ou B (FPB), respectivamente. Menos comuns que as enzimas que clivam preferencialmente uma das cadeias do fibrinogênio, algumas trombina-simile de peçonha de serpente são capazes de clivar ambas as cadeias, liberando tanto o FPA quanto o FPB em proporções semelhantes (PIRKLE & STOCKER, 1991; PIRKLE, 1998). Desta forma, as enzimas trombina-simile de peçonha de serpentes podem ser classificadas em: (i) FP-A, as quais clivam preferencialmente a cadeia A α do fibrinogênio; (ii) FP-B, as quais clivam preferencialmente a cadeia B β do fibrinogênio e (iii) FP-AB, que assim como a trombina, levam à coagulação sanguínea por clivarem ambas as cadeias do fibrinogênio (CASTRO et al., 2004).

Apesar das enzimas trombina-simile agirem preferencialmente sobre a conversão do fibrinogênio em fibrina, determinadas enzimas podem agir também em outros pontos da coagulação. Contortrixobina, uma enzima trombina-simile de *Agkistrodon contortrix contortrix*, além de ativar o fator XIII da coagulação, age também sobre o fator V, uma glicoproteína que exerce importante papel nas vias anti e pró-coagulante (AMICONI et al., 2000; ROSING et al., 2001). Outras SVSPs que agem sobre o fator V são a RVV-V de *Vipera russelli* (KISIEL, 1979; TOKUNAGA & IWANAGA, 1998) e VLFVA de *Vipera lebetina* (SIIGUR et al., 1998). A enzima RVV-V promove a ativação do fator V por liberar as cadeias leve e pesada desta molécula. As enzimas que mimetizam a ação do fator Xa, convertendo protrombina em α -trombina, são denominadas ativadoras de protrombina, e apresentam ação pró-coagulante *in vivo*, como o exemplo da Pseutarina C de *Pseudonaja textilis* (RAO & KINI, 2002) e trocarina D de *Tropidechis carinatus* (JOSEPH et al., 1999). Mais raras são as SVSPs pró-coagulantes que atuam sobre outros fatores da coagulação, como as enzimas ativadoras de fator X de *Ophiophagus hannah* (LEE et al., 1995) e *Bungarus fasciatus* (ZHANG et al., 1995), e a toxina oscutarin de *Oxyuranus scutellatus scutellatus* que promove a ativação do fator VII. Adicionalmente, muitas enzimas trombina-simile podem induzir a agregação plaquetária por ativarem os receptores para fator de von Willebrand e fibrinogênio (GPIb e GPIIb-IIIa, respectivamente), ou por clivarem os receptores ativados por proteinase (PAR) 1 e 4 (SERRANO & MAROUN, 2005; SAJEVIC et al., 2011). Assim, essas toxinas podem representar importantes ferramentas no estudo dos mecanismos fisiológicos envolvidos na ativação e agregação de plaquetas (CASTRO et al., 2004; MACKESSY, 2010).

Algumas SVSPs, por outro lado, apresentam ação anticoagulante por atuarem sobre fatores envolvidos da regulação negativa da coagulação sanguínea ou no processo de fibrinólise (SAJEVIC et al., 2011). A enzima ACC-C de *Agkistrodon contortrix contortrix* (KISIEL et al., 1987) é conhecida por promover a ativação da proteína C, responsável por inativar o fator Va. Já a TSV-PA de *Trimeresurus* (ZHANG et al., 1995), Haly-PA de *Agkistrodon halys brevicaudus* (PARK et al., 1998) e LV-PA de *Lachesis muta muta* (HERMOGENES et al., 2006) são serinoproteases que, assim como a TPA, convertem o plasminogênio em plasmina, induzindo o processo de fibrinólise.

Além dos efeitos sobre a hemostasia, algumas SVSPs podem atuar sobre o sistema circulatório induzindo hipotensão, como é o caso da Crotalase, isolada da peçonha de *Crotalus adamanteus* (MARKLAND & DAMUS, 1971; MARKLAND et al., 1982). Estas toxinas tem ação semelhante à caliceína, e por isso são conhecidas como caliceína-simile. As SVSPs caliceína-simile agem liberando bradicinina ou Lis-bradicinina a partir do cininogênio presente no plasma, intestino, útero e músculo liso (NUSTAD et al., 1978). A depleção dos níveis de cininogênio e hipotensão são quadros comuns decorrente de acidentes envolvendo cascavéis, resultantes da ação desse tipo de toxinas (SERRANO & MAROUN, 2005).

1.6. Aplicações clínicas e biotecnológicas das enzimas trombina-simile

Distúrbios no funcionamento normal do sistema circulatório podem resultar em desordens de caráter trombótico, nas quais, por razões muitas vezes desconhecidas, ocorrem formações espontâneas de coágulos que podem vir a obstruir artérias responsáveis pela irrigação de órgãos vitais, gerando graves complicações como infarto do miocárdio, derrames e isquemias. Diante da progressão do envelhecimento populacional, a busca por novas estratégias terapêuticas que visem o tratamento de doenças cardiovasculares e hematológicas, torna-se não somente importante, mas essencial para a saúde pública mundial.

As serinoproteases de peçonha de serpentes, por agirem em pontos específicos da cascata de coagulação, mimetizando a ação de componentes regulatórios naturais, são consideradas promissoras no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de determinadas desordens hemostáticas. Durante as últimas quatro décadas, as serinoproteases trombina-simile têm sido extensivamente estudadas tanto na área de pesquisa básica, quanto em estudos clínicos, em razão do uso potencial destas enzimas como agentes desfibrinogénantes em casos

de enfarto do miocárdio, acidente vascular cerebral isquêmico, controle de sangramento em cirurgias, entre outras desordens de caráter trombótico e vascular.

Ancrod e batroxobina são os exemplos mais conhecidos de agentes desfibrinogénantes de peçonha de serpentes utilizadas para fins terapêuticos. A batroxobina é uma serinoprotease isolada de *Bothrops atrox* com ação típica de enzimas trombina-simile. A batroxobina (Defibrase[®], Pentapharm - CH) tem sido usada em pacientes com trombose de veias profundas, infarto do miocárdio, angina, isquemia, entre outros (MACKESSY et al., 2010). Em um estudo realizado com um grupo de pacientes que apresentavam quadro de trombose em veias profundas, a batroxobina se mostrou eficaz em eliminar alguns sintomas, como dor, inchaço e eritema dos membros inferiores, mantendo a hipofibrinogemia por aproximadamente 14 dias e o alívio dos sintomas por até três meses (ZHANG et al., 2011a). A batroxobina também tem mostrado resultados positivos no controle da hiperfibrinogemia em pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico, quando injetada de forma intravenosa até três meses após o aparecimento dos sintomas (XU et al., 2007).

Além das aplicações terapêuticas, a batroxobina é utilizada também em testes diagnósticos, como o tempo de Reptilase. O ensaio de tempo de Reptilase é uma alternativa apropriada para mensurar tempo de trombina em amostras heparinizadas. Esta enzima também é empregada em ensaios de antitrombina III, removendo o fibrinogênio das amostras de plasma sem interferir nos resultados (MARSH & WILLIAMS et al., 2005).

Outra serinoprotease trombina-simile promissora para uso terapêutico é a Ancrod (Knoll, Ludwigshafen - DE), isolada de *Calloselasma rhodostoma*. Sob o nome comercial Viprinex[®], foi indicada inicialmente para o tratamento de acidente vascular isquêmico, e a sua eficiência e segurança vem sendo avaliada nos últimos anos. Porém, a Ancrod foi reprovada nos estágio III dos testes clínicos no tratamento de pacientes com isquemia, e atualmente não é mais produzida para uso em humanos com este tipo de coagulopatia (LEVY et al., 2009). No entanto, esta enzima é ainda utilizada fora dos Estados Unidos para o tratamento de outras desordens hemostáticas, como trombose em veias profundas e cirurgias coronarianas (MACKESSY et al., 2010).

Outra aplicação clínica das serinoproteases pró-coagulantes são os selantes de fibrina utilizados em cirurgias de diversas naturezas, principalmente cardiovascular e torácica (RADOSEVICH et al., 1997). Os selantes de fibrina são agentes hemostáticos que promovem a aderência e cicatrização de tecidos lesionados, prevenindo complicações decorrentes de extravasamento sanguíneo descontrolado, fístulas, granulomas, lacerações, inflamações e

isquemia tecidual. A giroxina, que é uma serinoprotease trombina-simile isolada da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, foi aprovada em testes com animais e humanos e é hoje empregada como um selante de fibrina seguro e com ampla aplicação (BARROS et al., 2009).

A HaemocoagulaseTM consiste em uma mistura composta por uma serinoprotease trombina-simile e uma enzima tromboplastina-simile da peçonha de *Bothrops atrox*. O mecanismo de ação deste composto se baseia na clivagem do fibrinogênio em fibrina pela enzima trombina-simile, seguido pela ativação do fator X pela tromboplastina-simile, que por sua vez, converte a protrombina em trombina, ativando a coagulação sanguínea e interrompendo o extravasamento sanguíneo em hemorragias. Este medicamento já está sendo utilizado em diversas áreas da medicina, como ginecologia, urologia, gastroenterologia e odontologia (<http://www.pentapharm.com/content.cfm?nav=21&content=40>).

Várias outras enzimas trombina-simile estão sendo submetidas a testes em modelos animais e clínicos para uso como agentes antitrombóticos. Além disso, as serinoproteases de peçonha de serpentes vêm se mostrando úteis para uma diversidade de aplicações biotecnológicas. A giroxina, por exemplo, quando marcada com ¹²⁵I, é aplicada em estudos de biodistribuição em modelos animais (da SILVA et al., 2006). A Ancrod apresenta aplicação nos estudos de polimerização de matrizes colágeno-fibrina, que podem ser utilizadas na bioengenharia de tecidos e biomateriais (ROWE & STEGEMANN, 2009).

Apesar do grande potencial terapêutico e biotecnológico das enzimas trombina-simile de peçonhas de serpentes, os mecanismos pelos quais estas enzimas afetam a coagulação sanguínea e outros sistemas do organismo não foram, até o momento, completamente esclarecidos. Assim, o investimento na pesquisa básica pode contribuir imensamente na elucidação das vias intrínsecas envolvidas nas ações biológicas destas moléculas. Ademais, quando a pesquisa básica se associa a estudos de aplicação das toxinas animais, o resultado é a inovação biotecnológica e o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para disfunções fisiológicas relacionadas ou não com o sistema circulatório.

1.7. Expressão Heteróloga de proteínas

O desenvolvimento de técnicas de produção de biomoléculas em escala laboratorial e industrial é de grande importância para viabilizar a disponibilização de novos agentes terapêuticos para a indústria farmacêutica. Desde que a insulina recombinante humana (Humulin[®]) foi aprovada em 1982 para o tratamento de diabetes mellitus, cada vez mais proteínas recombinantes estão sendo aprovadas para uso humano no tratamento de uma

diversidade de condições fisiopatológicas. Estes produtos compreendem hormônios, fatores de crescimento, anticorpos monoclonais, fatores sanguíneos, vacinas e enzimas terapêuticas (WALSH, 2006; LIM & BARNES, 2012).

Apesar da diversidade de ações fisiopatológicas apresentadas pelas toxinas de peçonha de serpentes, há uma significativa discrepância entre o enorme número de proteínas isoladas e caracterizadas e a quantidade de proteínas que vêm a se tornar efetivamente um medicamento. A principal dificuldade no desenvolvimento de pesquisas aplicadas na área de toxinologia deve-se às limitações na obtenção de toxinas em quantidades suficientes para uma caracterização estrutural e funcional detalhada e a impossibilidade de manipulação da molécula nativa. Desta forma, a expressão heteróloga de proteínas consiste em uma alternativa viável para a obtenção de toxinas em escala laboratorial para o estudo de suas atividades enzimáticas e biológicas, além da produção em escala industrial viabilizando a aplicação terapêutica e farmacológica dessas moléculas.

O processo de produção heteróloga de proteínas envolve múltiplas etapas e variáveis que podem resultar em alterações no produto final, modificando assim suas características funcionais primárias. Desta forma, o controle e validação dos processos biotecnológicos pelos quais as proteínas são produzidas são essenciais para avaliar se a molécula recombinante atende aos requisitos básicos necessários para utilização desta como agentes terapêuticos. Os problemas mais frequentemente associados com a expressão de proteínas em sistemas de eucariotos consistem na formação inadequada de pontes dissulfeto, diferenças de estrutura de carboidratos adicionados às glicoproteínas e a presença de produtos indesejados, como aqueles formados por deleção de aminoácidos, modificações químicas e processamento proteolítico.

A formação de pontes dissulfeto exerce um papel importante no processo de enovelamento e estabilização da estrutura tridimensional da molécula. Assim, a análise do estado de conectividade dos resíduos de cisteína após a tradução é essencial, uma vez que ligações dissulfeto realizadas incorretamente podem resultar em prejuízo à funcionalidade da proteína. Da mesma forma, a adição de cadeias de carboidratos modificadas às proteínas recombinantes pode alterar significativamente a solubilidade, estabilidade, imunogenicidade e resistência à proteólise das moléculas. Modificações no padrão de glicosilação de proteínas podem ainda exercer impactos sobre a conformação molecular, o que pode resultar na mudança de suas propriedades biológicas e capacidade de interagir com outras proteínas e ligantes (LIM & BARNES, 2012).

A seleção de um sistema apropriado para a expressão de uma determinada proteína é dependente das características e pretensão da aplicação desta, de modo que este sistema seja capaz de produzir a molécula na sua forma funcional e em larga escala. Determinadas SVSPs foram previamente expressas em diversos sistemas, como bactérias (MAEDA et al., 1991; FAN et al., 1999; DEKHIL et al., 2003; YANG et al., 2003; ZHA et al., 2003; LIN et al., 2009; JIANG et al., 2010), leveduras (YOU et al., 2004; MUANPASITPORN & ROJNUCKARI., 2007; YANG et al., 2009) e células de mamíferos (YONAMINE et al., 2009). Contudo, a obtenção da proteína recombinante com integridade funcional só é alcançada em sistemas eucarióticos de expressão, uma vez que as SVSPs são glicoproteínas de enovelamento complexo e ricas em pontes dissulfeto.

O sistema de expressão heteróloga em *Pichia pastoris* combina fácil manipulação genética e rápido crescimento à capacidade de promover muitas das modificações pós-traducionais realizadas por células eucarióticas superiores, como processamento proteolítico, enovelamento, formação de pontes dissulfeto e glicosilação de proteínas, que são cruciais na obtenção de moléculas biologicamente ativas (CREGG et al., 2000; LIN-CEREGHINO & CREGG, 2000). No entanto, as N-glicosilações realizadas por leveduras geralmente envolvem a formação de polissacarídeos compostos por 100 ou mais resíduos de manose, resultando, muitas vezes, na hiperglicosilação da proteína heteróloga. Além disso, devido à ausência de sequência consenso para O-glicosilações, não é possível presumir que o sistema de *P. pastoris* adicionará carboidratos por ligações O-glicosídicas em sítios não glicosilados na molécula nativa. (LIN-CEREGHINO & CREGG, 1999; CREGG et al., 2000; PORRO et al., 2005). Estas diferenças entre os padrões de glicosilações de leveduras e eucariotos superiores podem potencialmente interferir com o correto enovelamento e funcionalidade da molécula recombinante.

Neste contexto, o presente trabalho apresenta a expressão de uma serinoprotease clonada da glândula de peçonha de *C. d. collilineatus* em células de *Pichia pastoris*, assim como a avaliação comparativa das propriedades enzimáticas das enzimas nativa e recombinante, de forma a validar este processo de produção. O interesse em realizar a expressão heteróloga destas toxinas deve-se ao baixo rendimento na obtenção de proteínas da peçonha bruta, o que dificulta a realização de procedimentos experimentais. Além disso, a obtenção da peçonha e o processo de purificação da proteína nativa são procedimentos dispendiosos, dificultando assim as aplicações terapêuticas e biotecnológicas destas enzimas. Este projeto poderá gerar também perspectivas para estudos que visem elucidar aspectos na

estrutura da molécula relacionados às suas propriedades funcionais, permitindo o desenho de moléculas recombinantes mutantes, visando potencializar as propriedades farmacológicas e minimizar seus efeitos adversos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Este trabalho teve como objetivo geral a expressão uma serinoprotease previamente clonada da glândula de peçonha de *Crotalus durissus collilineatus* e a análise comparativa de algumas propriedades enzimáticas e funcionais da proteína nas formas recombinante e nativa.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliação *in silico* das sequências de serinoproteases obtidas da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha de *C. durissus collilineatus*
- Clonagem da serinoprotease de *C. d. collilineatus* e construção do plasmídeo de expressão em *P. pastoris*;
- Expressão e purificação da serinoprotease recombinante;
- Purificação da protease nativa a partir da peçonha bruta de *C. d. collilineatus*;
- Determinação da massa molar das proteínas nativa e recombinante;
- Determinação da sequência parcial de aminoácidos das proteínas por técnicas de espectrometria de massas e degradação de Edman, e alinhamento múltiplo das sequências obtidas com outras serinoproteases de peçonha de serpentes;
- Determinação da atividade proteolítica das enzimas nativas e recombinantes sobre o fibrinogênio, e avaliação da liberação dos fibrinopeptídeos A e B;
- Determinação da atividade coagulante das proteínas sobre o plasma bovino e cálculo da dose mínima coagulante para cada uma das enzimas (DMC);
- Determinação da especificidade proteolítica das enzimas sobre os substratos cromogênicos S-2251, S-2222, S-2238 e S-2302;
- Avaliação da influência de inibidores específicos para serinoproteases e metaloproteases sobre a hidrólise do substrato S-2302;
- Avaliação da influência de íons divalentes na atividade esterásica das proteínas sobre o substrato N- α -tosil-L-arginina metil éster (TAME);
- Avaliação da estabilidade das proteínas em diferentes condições de temperatura;
- Análise dos parâmetros cinéticos da serinoprotease na forma nativa e recombinante sobre o substrato TAME;

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Peçonha

A peçonha de *Crotalus durissus collilineatus* foi extraída de exemplares coletados do estado de Goiás, Brasil. Após a extração, a peçonha foi dessecada a vácuo à temperatura ambiente e conservada a -20 °C. As serpentes foram mantidas em cativeiro, no Serpentário Bioagents de Batatais – SP, Brasil.

3.2. Sequenciamento de nucleotídeos da serinoprotease

Os clones correspondentes à serinoprotease, obtidos da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha de *C. d. collilineatus* (BOLDRINI-FRANÇA, et al. 2009), foram sequenciados utilizando oligonucleotídeo senso interno (5' – GCCTGATGTCCCTCATTGTGC – 3'), desenhado a partir da sequência parcial previamente determinada, para a obtenção da sequência de nucleotídeo completa da SVSP. O sequenciamento automático foi realizado no equipamento *MEGA-BACE 1000 automated DNA sequencer* (GE Healthcare), utilizando o kit *DYEnamic ET Dye Terminator* (GE Healthcare), a partir de 300 ng de DNA modelo.

3.3. Avaliação *in silico* da sequência de nucleotídeos da serinoprotease

Os parâmetros físico-químicos teóricos da serinoprotease foram calculados pelo programa ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). A fase aberta de leitura (ORF – *open reading frame*) da sequência de nucleotídeos foi analisada pelo software *BioEdit Alignment Editor*, versão 7.0.5.3 (HALL, 1999). A determinação de possíveis sítios de clivagem do peptídeo sinal foi realizada com auxílio do software online SignalIP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). A predição da presença de sequências consenso de reconhecimento de N-glicosilações foi desempenhada pelo algoritmo NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). As sequências parciais das serinoproteases de *C. d. collilineatus*, obtidas pelas técnicas de degradação de Edman e sequenciamento *de novo* de peptídeos por espectrometria de massas, foram alinhadas entre si utilizando o algoritmo *online MultiAlin* (CORPET, 1988). A sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos da serinoprotease foi avaliada quanto à identidade em relação a sequências depositadas no banco de dados internacional GenBank por meio do algoritmo BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). As sequências que apresentaram maior porcentagem de

identidade foram selecionadas e alinhadas com a sequência deduzida pelo programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

3.4. Expressão heteróloga de proteínas

3.4.1. Construção do vetor para expressão da SVSP em *Pichia pastoris*

O gene que codifica a serinoprotease foi amplificado pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) a partir do vetor pDONRTM222-SVSP, previamente obtido da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha de *C. d. collilineatus* (BOLDRINI-FRANÇA, et al. 2009). Para a amplificação gênica, foram desenhados oligonucleotídeos específicos sem peptídeo sinal e pro-peptídeo, contendo sítios de clivagem para as enzimas *XhoI* e *Kex2* no oligonucleotídeo senso (5' – CCGCTCGAGAAAAGAGTCATTGGAGGAGATGAATG – 3'), e o sítio de restrição para a enzima *NotI* no oligonucleotídeo antissenso (5' – AAATATGCGGCCGCGAGGGGCAATTCACAGTTTC – 3'). Os produtos das PCRs e o vetor de expressão para proteínas secretadas pPICZαA (Invitrogen) foram submetidos à digestão com as enzimas *XhoI* e *NotI*, e posteriormente aplicados em gel de agarose 1%, do qual as bandas de interesse foram recortadas para a purificação do cDNA utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

A ligação do inserto que codifica a serinoprotease no vetor foi realizada por meio de reação com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) por 16 h a 16°C. Células de *Escherichia coli* DH5α, CaCl₂ competentes, foram transformadas por choque térmico para incorporação do plasmídeo recombinante, e foram posteriormente plaqueadas em meio LB (1% tripton, 0,5% NaCl e 0,5% extrato de levedura), contendo 25 µg/mL de Zeocina (Invitrogen), e incubadas a 37°C por 16 horas para seleção das colônias recombinantes. A mesma reação, sem a adição do inserto, foi utilizada na transformação de bactérias como forma de controle para a determinação da proporção do *background* experimental. Os plasmídeos recombinantes presentes nas colônias selecionadas foram purificados por lise alcalina, pela técnica de minipreparação (*miniprep*) (BIRNBOIM & DOLY, 1979). A presença dos insertos foi confirmada por digestão dos plasmídeos com as enzimas de restrição utilizadas na clonagem do gene. A clonagem no inserto na correta fase de leitura foi confirmada por sequenciamento automático de nucleotídeos, utilizando o kit *ET Dye Terminator* e o equipamento *MEGA-BACE 1000 automated DNA sequencer* (GE Healthcare – UK).

3.4.2. Transformação de células de *P. pastoris* e seleção de colônias recombinantes

Para a transformação da levedura *P. pastoris*, o plasmídeo pPICZαA-Collineina1 foi linearizado com a enzima de restrição *SacI* (New England Biolabs). Em seguida, o plasmídeo linearizado foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de *P. pastoris* da linhagem KM71H, previamente incubadas com ditiotreitol (DTT), para aumentar a eficiência da transformação, lavadas e ressuspensas em sorbitol 1 M (CREGG, 2007).

O DNA linearizado (5 µg) foi primeiramente incubado por 5 min com 40 µL de células competentes. Em seguida, a mistura foi transferida para cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad) e submetida à eletroporação no equipamento GenePulser II (Bio-Rad) nas seguintes condições: 1500 V, 25 µF, 200 Ω. O mesmo procedimento foi realizado com o plasmídeo sem o inserto, para utilização como controle negativo de expressão. Após o choque, 50, 100 e 200 µL de células foram plaqueados em meio YPDS ágar (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose, 1 M sorbitol e 2% ágar) contendo 100 µg/mL de zeocina, e incubados a 30°C por 3 a 5 dias para a seleção dos transformantes.

Para a seleção de colônias recombinantes contendo múltiplas cópias do gene, as células (200 µL) foram plaqueadas em meio YPDS contendo 500 µg/mL de zeocina e incubadas nas condições descritas anteriormente. As colônias recombinantes foram então submetidas a PCR de colônia, e o produto da reação foi visualizado em gel de agarose 1% para a confirmação da incorporação do inserto no DNA genômico da levedura.

3.4.3. Triagem em placa da expressão da proteína recombinante

As condições de expressão da proteína recombinante foram testadas conforme descrito no manual *Easy Select Pichia Expression* (Invitrogen), com modificações. As colônias que apresentaram resultado positivo para presença do inserto na análise do PCR de colônia de *P. pastoris* foram selecionadas e individualmente inoculadas em placa *deep well* de 24 poços contendo 3 mL de meio BMGY (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1,34% YNB, 4 x 10⁻⁵ biotina, 1% glicerol, 100 mM fosfato de potássio) por poço. Como controle negativo, um clone contendo o plasmídeo pPICZαA sem incorporação do cassete de expressão foi inoculado nas mesmas condições. A placa de triagem foi incubada a 30°C sob agitação constante de 250 rpm.

Após 48 h, as culturas foram centrifugadas a 1500 xg, o sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em 2 mL de meio BMMY (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1,34% YNB, 4 x 10⁻⁵ biotina, 1% metanol, 100 mM fosfato de potássio) para a

indução da expressão, e então as culturas foram incubadas a 26°C sob agitação constante. Para a manutenção da indução, foi realizada reposição de metanol para uma concentração final de 0,75% a cada 24 h. Alíquotas da indução foram coletadas no tempo de 96 h, centrifugadas a 10.000 *xg*, e os sobrenadantes foram então analisados em SDS-PAGE 13,5% corado com *Comassie Brilliant Blue* e prata para a determinação dos níveis de expressão.

A colônia que apresentou maior taxa de expressão da proteína recombinante foi submetida a uma nova triagem para a determinação de condições de pH e composição do meio ideais para um maior rendimento protéico. Para isso, a colônia foi inoculada nas mesmas condições descritas anteriormente, com a diferença de que, após 48h de geração de biomassa, as células foram centrifugadas e ressuspensas em meios complexos tamponados de diferentes pHs (BMMY, pH 4,0, 6,0 e 7,0), meios mínimos tamponados de diferentes pHs (BMM [1,34% YNB, 4 x 10⁻⁵ biotina, 1% metanol, 100 mM fosfato de potássio], pH 4,0, 6,0 e 7,0) e meio mínimo não tamponado (MM [1,34% YNB, 4 x 10⁻⁵ biotina, 1% metanol]). Após 96h de indução, os sobrenadantes das culturas foram analisados em SDS-PAGE 13,5% corado com *Comassie Brilliant Blue* e prata. As condições que possibilitaram a maior taxa de expressão da proteína recombinante foram utilizadas para a expressão de proteínas em larga escala.

3.4.4. Expressão de proteínas em larga escala

A colônia selecionada na triagem em placa foi pré-inoculada em erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de meio BMGY (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1,34% YNB, 4 x 10⁻⁵ biotina, 1% glicerol, 100 mM fosfato de potássio), e incubada a 30°C sob agitação constante de 250 rpm. Após 24hs, a cultura foi inoculada em erlenmeyer de 2 L, contendo 500 mL de meio BMGY, e incubada a 30°C sob agitação constante de 250 rpm, até atingir uma densidade óptica de 2 a 6 em comprimento de onda de 600 nm. Após atingir a densidade óptica desejada, a cultura foi centrifugada a 1500 *xg*, o sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em 100 mL de meio BMM (1,34% YNB, 4 x 10⁻⁵ biotina, 1% metanol, 100 mM fosfato de potássio pH 7,0) em erlenmeyer de 1L a 26°C sob agitação constante de 250 rpm.

Para a manutenção da indução, foi realizada reposição de metanol a uma concentração final de 0,75% a cada 24 h. Após 96 h de indução, a cultura foi centrifugada a 10.000 *xg*. Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado, filtrado e utilizado para a purificação da proteína recombinante.

3.5. Purificação de proteínas

3.5.1. Purificação da serinoprotease recombinante

Para a purificação da proteína recombinante foram utilizadas técnicas cromatográficas de troca iônica e fase reversa, realizadas em sistema de cromatografia rápida de proteínas (FPLC - *Fast Protein Liquid Chromatography*) Äkta Purifier UPC10 (GE Healthcare – UK). Após 96 h de indução, a cultura de expressão foi centrifugada a 10.000 $\times g$ por 10 min, e o sobrenadante foi separado, filtrado em membrana de poro de 0,4 μm e concentrado em unidade de filtração por centrifugação *Amicon Ultra-4* (Millipore – USA), com membrana de 10 kDa. O meio concentrado foi então incubado com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0 contendo 7 M de ureia em uma proporção de 1:5 (v/v), por 90 min à temperatura ambiente.

Após o período de incubação, o meio foi aplicado em coluna de troca iônica MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare – UK), de dimensões 5 x 50 mm, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0. A eluição foi realizada com gradiente descontínuo até 1 M de NaCl, a uma vazão de 1 mL/min, coletando 0,5 mL por tubo. A fração com atividade coagulante obtida da troca iônica foi submetida à cromatografia de fase reversa em coluna C4 de dimensões 0,46 x 25 cm e partícula de 5 μm (Shodex - JP), pré-equilibrada com o solvente A (0,1% de ácido trifluoroacético). Para a eluição dos componentes da amostra, foi utilizado gradiente linear até uma concentração de 100% de solução B (0,1% de ácido trifluoroacético e 80% de acetonitrila), a uma vazão de 0,8 mL/min, coletando 0,5 mL por tubo. A pureza da proteína foi verificada por simetria do pico cromatográfico e perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). O pico correspondente à proteína purificada foi congelado a -80°C, liofilizado e armazenado a -20°C para ensaios posteriores.

3.5.2. Purificação da serinoprotease nativa da peçonha bruta de *C. durissus collilineatus*

A purificação da toxina nativa da peçonha de *C. durissus collilineatus* foi feita pela combinação de técnicas cromatográficas de gel-filtração, troca iônica e fase reversa. Todas as cromatografias foram realizadas em sistema de cromatografia rápida de proteínas (FPLC - *Fast Protein Liquid Chromatography*) Äkta Purifier UPC10 (GE Healthcare – UK).

A peçonha bruta de *C. d. collilineatus* (50 mg) foi inicialmente dispersa em tampão formiato de amônia 0,05 M, pH 3,5, seguida pela adição 10 μL de ácido fórmico para melhor solubilização das proteínas da peçonha. A amostra foi centrifugada a 13000 $\times g$ por 10 min, e o

sobrenadante foi aplicado em coluna de gel filtração Sephacryl S100 HR de dimensões 1,6 x 60 cm (GE Healthcare – UK), pré-equilibrada com o mesmo tampão utilizado na dispersão da peçonha. A eluição das frações foi monitorada com leitor de UV a 280 nm, a uma vazão de 0,5 mL/min, coletando 1,2 mL por tubo.

As frações que apresentaram atividade coagulante foram agrupadas e concentradas em unidade de filtração por centrifugação *Amicon Ultra-4* (Millipore – USA) com membrana de 10 kDa e, posteriormente, aplicadas em coluna de troca iônica MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare – UK), de dimensões 5 x 50 mm, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0. A eluição foi realizada com gradiente descontínuo até 1 M de NaCl, a uma vazão de 1 mL/min, coletando 0,5 mL por tubo.

A fração com atividade coagulante obtida da troca iônica foi submetida à cromatografia de fase reversa em coluna C4 de dimensões 0,46 x 25 cm e partícula de 5 μ m (Shodex - JP), pré-equilibrada com o solvente A (0,1% de ácido trifluoroacético). Para a eluição dos componentes da amostra, foi utilizado gradiente descontínuo até 100% de solução B (0,1% de ácido trifluoroacético e 80% de acetonitrila), com uma vazão de 0,8 mL/min, coletando 0,5 mL por tubo. A pureza da proteína foi verificada por simetria do pico cromatográfico e perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Os picos correspondentes às proteínas puras foram congelados a -80°C, liofilizados e armazenados a -20°C para ensaios posteriores.

3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As proteínas nativa e recombinante, assim como a atividade fibrinogenolítica, foram avaliadas em gel de poliacrilamida a 13,5% (m/v) em condições desnaturantes, na presença de SDS e β -mercaptoetanol, assim como descrito por Laemmli (1970). Os géis foram corados com *Comassie Brilliant Blue* ou prata, dependendo da quantidade de proteína aplicada.

3.7. Quantificação de proteínas

Para a quantificação de proteínas, foi utilizado o reagente de Bradford, conforme método descrito por Bradford (1975). A curva padrão foi determinada a partir de diferentes concentrações de soro albumina bovina (BSA), considerando o coeficiente de extinção molar a 280 nm de $0,665 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.8. Caracterização estrutural

3.8.1. Determinação da massa molar

A massa molar das proteínas foi determinada por espectrometria de massas no modo MS/MS em aparelho Synapt G2-S (Waters - UK) com ionização por nano-eletrospray (nano-ESI). As amostras foram preparadas em microcoluna *Zip Tip* contendo resina de fase reversa C18 (Merck Millipore - DE) equilibrada com ácido fórmico (FA) 0,2% (v/v), e eluídas com 10 µL de solução contendo FA 0,2% e acetonitrila (ACN) 80%, para eliminação de sais e outros interferentes. A solução eluída da microcoluna *Zip Tip* (4 µL) foi aplicada em capilar de platina e ionizada a uma voltagem de 2 kV no capilar, 20 V no cone de entrada, temperatura de dessolvatação de 60°C, a um fluxo de 200 nL/min. Os espectros foram coletados na forma de média de scans e processados utilizando o software MassLynx 4.1 (Waters - UK).

3.8.2. Sequenciamento amino-terminal

A sequência amino-terminal dos primeiros 58 resíduos de aminoácidos da Collineina-1 foi obtida pelo método de degradação de Edman (EDMAN & BEGG, 1967). Após os procedimentos de purificação, a proteína foi aplicada diretamente em uma membrana de fibra de vidro (Wako - JP) e submetida à análise em Sequenciador Automático de Proteínas, modelo PPSQ-33A (Shimadzu - JP). O aminoácido derivado da reação com o PITC foi convertido a PTH- aminoácido e cromatografado em sistema HPLC, utilizando coluna de fase reversa e gradiente isocrático. A quantificação e identificação dos resíduos foram realizadas por meio da comparação com os tempos de retenção do padrão de aminoácidos (25 pmol), cromatografado antes do sequenciamento.

3.8.3. Sequenciamento *de novo* de peptídeos por MALDI-TOF/TOF

As amostras de proteínas foram primeiramente submetidas à redução com ditioneitol (DTT), alquilação com iodoacetamida e digestão com tripsina. Para isso, as amostras foram purificadas em microcoluna de fase reversa *Zip Tip* C18 (Merck Millipore - DE), equilibrada com 0,2% de ácido fórmico (FA) (v/v), e eluídas com 10 µL de solução contendo 0,3% de FA e 80% de acetonitrila (ACN), para remoção de sais e outros interferentes.

Cerca de 3 µg de proteínas foram secados em centrífuga rotatória a vácuo (Speed-Vac, Thermo Savant - UK) e ressuspensos em solução de bicarbonato de amônio a 0,05M. A esta

solução, foi adicionado DTT a uma concentração final de 10 mM, e a solução foi incubada à 56°C por 40 min a uma agitação de 600 rpm. A reação de alquilação foi realizada pela incubação da amostra com iodoacetamida a uma concentração final de 20 mM, por 30 min à temperatura ambiente. Após a reação de alquilação, a iodoacetamida foi inativada pela incubação da amostra com DTT a uma concentração final de 21 mM, por 10 min à temperatura ambiente.

A digestão das proteínas foi realizada pela incubação da amostra com tripsina a uma concentração final enzima/substrato de 1:50 (m/m) à 37°C por 16 h em agitação de 600 rpm. Uma segunda digestão foi realizada pela adição de tripsina a uma concentração final enzima/substrato de 1:100 (m/m) e adição de ACN a uma concentração final de 80% (v/v). As amostras foram então incubadas à 37°C por 3 h em agitação de 600 rpm e a reação foi interrompida pela adição de FA a uma concentração final de 0,2% (v/v).

Após a reação de redução, alquilação e digestão, os peptídeos resultantes foram secados em centrífuga rotatória a vácuo (Speed-Vac, Thermo Savant - UK), ressuspensos em 10 µL de solução contendo 0,2% de FA, e purificados em microcoluna de fase reversa *Zip Tip C18* (Merck Millipore - DE) equilibrada com FA 0,2% (v/v), e eluídos com 10 µL de solução contendo 0,2% de FA e 80% de ACN. A solução contendo os peptídeos tripsínicos (1 µL) foi cossedimentada com a matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) (10 mg/mL em solução contendo 0,2% de FA e 80% de ACN), na proporção 1:1 (v/v).

As amostras foram ionizadas pela técnica de Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz e analisadas em espectrômetro de massas duplo TOF (MALDI-TOF/TOF), modelo *Ultraflex II* (Bruker Daltonics - DE), equipado com uma fonte de laser do tipo *Nd-YAG Smartbeam laser* (MLN 202, LTB). A potência do laser foi ajustada para 32% com incidência de 500 a 1000 tiros, de forma a gerar uma razão sinal/ruído satisfatória. Os íons foram detectados com o analisador operado no modo refletido positivo, e calibrado com o padrão de massas *Bruker peptide standard II* (Bruker Daltonics, DE).

Primeiramente, foram obtidos dados do *mass fingerprinting* dos peptídeos tripsínicos, que foram analisados pelo algoritmo MASCOT contra os bancos de dados NCBI e Swissprot na tentativa de buscar sequências com alto grau de identidade em relação às serinoproteases analisadas. Cada íon de peptídeo identificado foi submetido à fragmentação por Dissociação Induzida por Colisão (CID - *Collision induced dissociation*) utilizando a célula LIFTTM do aparelho, na qual o íon precursor e seus fragmentos são selecionados e reacelerados a uma potência cinética de 19 keV. Para a fragmentação, a potência do laser foi ajustada para 60%, e

os espectros foram obtidos com o uma frequência de 500 a 1000 tiros em uma ordem de massas de 50 a 5000 Da. Os fragmentos foram detectados no modo positivo refletido e os espectros resultantes foram utilizados para a dedução da sequência de proteínas com a auxílio dos softwares FlexAnalysis 3.0 e BioTools 3.1 (Bruker Daltonics Softwares, DE).

3.8.4. Sequenciamento *de novo* de proteínas por ESI - *Ion Trap* quadrupolo

Para o sequenciamento de peptídeos que não foram detectados por MALDI-TOF/TOF, as enzimas foram submetidas à redução, alquilação e digestão, assim como descrito no item 3.8.3, e os peptídeos resultantes foram fragmentados e analisados em espectrômetro de massas *amaZon Ion Trap* (Bruker Daltonics - DE). Para isso, 2 µL da amostra de digestão foram diluídos em 9 µL de solução contendo 0,1% de ácido fórmico e 50% de acetonitrila (v/v) e infundidos diretamente no sistema *Advion Triversa Nanomate* (Advion - UK). A amostra foi ionizada pela técnica de eletrospray, e os peptídeos triplamente carregados foram submetidos à fragmentação por dissociação por transferência de elétrons (ETD). Os espectros resultantes da fragmentação foram analisados com auxílio do software FlexAnalysis 3.0 e BioTools 3.1 (Bruker Daltonics Softwares, DE) para a dedução da sequência de aminoácidos.

3.9. Caracterização enzimática e funcional

3.9.1. Atividade fibrinogenolítica

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio foi realizada segundo descrito por Rodrigues e colaboradores (2000). 50 µL de uma solução de fibrinogênio bovino (1,5 mg/ml) foram incubados com 10 µg de proteína em 10 µL de água Milli-Q a 37°C durante diferentes intervalos de tempo (5, 15, 30, 60, 120 e 240 min). Para o controle negativo, 50 µL da solução de fibrinogênio bovino foram incubados com 10 µL de água Milli-Q nas condições descritas anteriormente. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de solução STOP (Tris-HCl 0,06 M, pH 6,8, azul de bromofenol 0,001%, glicerol 10% e 10% de β-mercaptoetanol). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100°C por 10 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 13,5% com SDS (PAGE-SDS).

3.9.2. Identificação dos fibrinopeptídeos resultantes da clivagem do fibrinogênio

A identificação dos fibrinopeptídeos resultantes da ação proteolítica das serinoproteases foi realizada segundo descrito por Magalhães e colaboradores (2003), com

algumas modificações. Os fibrinopeptídeos foram gerados pela incubação de 10 µg das enzimas com 1 mL de solução de fibrinogênio bovino (Sigma-Aldrich) (3 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,5, contendo 0,05M de CaCl₂), à 37°C por diferentes intervalos de tempo (5, 30, 60 e 120 min). A trombina foi incubada com fibrinogênio por 120 min como controle positivo, e a solução de fibrinogênio sem a adição de enzima foi utilizado como controle negativo.

Após a reação, as proteínas foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético (TCA) a uma concentração final de 2%, e sedimentadas por centrifugação das amostras a 13.000 *xg* por 10 min. Os sobrenadantes foram submetidos à cromatografia de fase reversa em coluna Vydac C18 de dimensões 0,46 x 25 cm e partícula de 5 µm, pré-equilibrada com o solvente A (0,1% de ácido trifluoroacético). Os fibrinopeptídeos foram eluídos da coluna por meio de um gradiente segmentado (0-15% com 5 volumes de coluna e 15-30% com 15 volumes de coluna) de solução B (0,1% de ácido trifluoroacético e 80% de acetonitrila), a uma vazão de 0,8 mL/min, coletando 0,5 mL por tubo. A eluição dos fibrinopeptídeos foi monitorada com leitor de UV a 214 nm. A identificação dos fibrinopeptídeos foi confirmada por sequenciamento amino-terminal dos peptídeos purificados, assim como descrito no item 3.9.2.

3.9.3. Determinação da dose mínima coagulante

O ensaio foi realizado assim como descrito por Assakura e colaboradores (1992), com algumas modificações. Para a determinação da dose mínima coagulante (DMC), foram aplicadas diferentes quantidades de enzima (10, 15, 20, 30 e 40 µg) em 150µL de plasma bovino citratado, e o tempo de formação do coágulo de fibrina foi determinado por sistema fotométrico em coagulômetro Quick Timer II (Draker - BR). A DMC foi definida como a quantidade de enzima necessária para coagular o plasma bovino citratado à 37°C em 60 segundos de reação.

3.9.4. Atividade proteolítica sobre substratos cromogênicos

A atividade proteolítica das serinoproteases foi avaliada sobre os seguintes substratos cromogênicos: S-2251 para plasmina (H-D-Valyl-L-leucyl-L-lysine-p-Nitroaniline dihydrochloride), S-2222 para fator Xa (N-Benzoyl-L-isoleucyl-L-glutamylglycyl-L-arginine-p-nitroaniline hydrochloride e seu methyl ester), S2238 para trombina (H-D-Phenylalanyl-L-

pipecolyl-L-arginine-p-nitroaniline dihydrochloride) e S-2302 para calicreína plasmática (H-D-Prolyl-L-phenylalanyl-L-arginine-p-nitroaniline dihydrochloride) (Chromogenix - IT).

A hidrólise dos substratos foi determinada pela incubação de 4,0 µg de proteínas com a solução de substrato em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,5 contendo 0,05M de CaCl₂, em uma concentração final de 0,4 mM. As soluções reacionais foram incubadas durante 40 minutos a 37°C, e a hidrólise foi monitorada por espectrofotometria a 405 nm, utilizando leitora de Microplacas Versamax (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA). Uma unidade de atividade foi definida como o aumento de 0,01 unidade de absorbância a 405 nm, e os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

O substrato S-2302 também foi utilizado para determinar a ação dos inibidores fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e 1,10 fenantrolina sobre a atividade proteolítica das serinoproteases. Para isso, as enzimas foram pré-incubadas com 20 mM dos inibidores por 30 min à 37°C, e a reação foi realizada assim como descrito anteriormente. A relação dose-resposta das proteínas foi avaliada utilizando este mesmo substrato e diferentes quantidades de proteína (0,5, 1, 2,5 e 5 µg). A reação foi conduzida como descrito anteriormente e monitorada nos tempos de 10, 20 e 40 min de incubação. Os ensaios foram realizados em uma série de três repetições e os dados foram ajustados com os respectivos erros padrões utilizando o software *GraphPad Prism*, versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego - USA).

3.9.5. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os ensaios de cinética enzimática foram realizados pelo monitoramento da atividade esterásica das proteínas sobre o substrato N-p-tolueno-sulfonil arginina metil éster (TAME), de acordo com metodologia descrita por Hummel (1959). Para os ensaios de atividade esterásica, as proteínas (5 µg) foram incubadas com diferentes concentrações de TAME (0,125 a 2 mM) em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,5 contendo 0,05M de CaCl₂, em um volume final de 1 mL. A atividade foi monitorada por absorbância a 247 nm após 30 min de reação à 37°C.

A velocidade da reação (V_0) foi expressa em mM de produto formado por minuto, considerando o coeficiente de extinção molar de 540 M⁻¹.cm⁻¹ para o produto. Os valores de K_m e V_{max} das enzimas para o substrato TAME foram determinados a partir da curva cinética hiperbólica de Michaelis-Menten, e os valores de *turnover* (K_{cat}) e da eficiência catalítica (K_{cat}/K_m) foram calculados a partir dos valores de K_m e V_{max} . Os experimentos foram

realizados em uma série de três repetições cada, e os dados foram ajustados com os respectivos erros padrões utilizando o software *GraphPad Prism*, versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego - USA).

3.9.6. Estabilidade a diferentes condições de temperatura

Para a avaliação da estabilidade das enzimas a diferentes condições de temperatura, a atividade esterásica das proteínas sobre o substrato TAME foi monitorada de acordo com protocolo descrito no item 3.9.5. As proteínas foram pré-incubadas por 30 min a diferentes temperaturas (25, 37, 45, 60, 80 e 100°C), e em seguida a atividade enzimática sobre o TAME foi avaliada. Uma unidade de atividade esterásica (U) foi definida como o aumento de 0,01 unidade de absorbância a 247 nm, e os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

O ensaio foi realizado em uma série de três repetições, e os dados foram ajustados com os respectivos erros padrões utilizando o software *GraphPad Prism*, versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego - USA).

3.9.7. Efeito de íons divalentes sobre a atividade esterásica

Para a avaliação da influência de diferentes cátions divalentes (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} e Mg^{2+}) sobre a atividade esterásica das serinoproteases, as proteínas foram pré-incubadas com tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,5, contendo 10 mM dos íons por 30 min à 37°C. Em seguida, a atividade enzimática foi avaliada como descrito no item 3.9.5, com a diferença que o tampão utilizado para solubilização do TAME não apresentava CaCl_2 . A atividade esterásica da enzima pré-incubada com tampão sem adição de cátions divalentes foi avaliada e utilizada como controle.

Os resultados foram expressos em unidade de atividade esterásica (U) por miligrama de proteína, sendo que uma unidade de atividade foi definida como o aumento de 0,01 unidades de absorbância a 247 nm. O ensaio foi realizado em uma série de três repetições, e os dados foram ajustados com os respectivos erros padrões utilizando o software *GraphPad Prism*, versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego - USA).

3.10. Análise estatística dos resultados

A análise de variância estatística (ANOVA) e o teste Tukey, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), foram realizados com auxílio do software *GraphPad Prism*, versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego - USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Sequenciamento de nucleotídeos e análise *in silico* da sequência da serinoprotease

As etiquetas de sequências expressas (ESTs - *Expressed Sequence Tags*) correspondentes à serinoprotease, obtidas da biblioteca de cDNA de *C. d. collilineatus* (BOLDRINI-FRANÇA et al, 2009), continham somente sequências incompletas da fase aberta de leitura (ORF – *Open Reading Frame*). Desta forma, para obtenção da sequência de nucleotídeos completa dos clones correspondentes à serinoprotease, foi utilizado um oligonucleotídeo senso interno na reação de sequenciamento. A sequência de cDNA da serinoprotease (Fig. 3), denominada Collineina-1, codifica uma proteína de 262 resíduos de aminoácidos, que inclui um peptídeo sinal (18 resíduos de aminoácidos), um pró-peptídeo (6 resíduos de aminoácidos) e um domínio serinoprotease com 238 resíduos de aminoácidos, indicando que a proteína é expressa na forma de um zimógeno. Os parâmetros físico-químicos teóricos indicam que a toxina apresenta massa molar de 26638,3 Da e ponto isoeletrico de 5,98.

Diversas serinoproteases ácidas e básicas foram previamente isoladas de peçonhas ofídicas, sendo que as serinoproteases de caráter básico frequentemente apresentam ação direta sobre a agregação plaquetária, enquanto as serinoproteases de caráter ácido desempenham atividade proteolítica sobre uma variedade de substratos relacionados à coagulação sanguínea (SERRANO & MAROUN, 2005). A Collineina-1 apresentou coeficiente de extinção relativo em 280 nm ($\epsilon^{1 \text{ g/L}}$) de 1,659, assumindo que todos os resíduos de cisteínas aparecem na condição de meia cistina. O domínio serinoprotease possui um sítio teórico de N-glicosilação na posição 81, no qual é encontrada a sequência consenso composta pelo tripeptídeo Asn-X-Ser/Thr, o que pode resultar em uma discrepância na massa molar determinada por SDS-PAGE e espectrometria de massas, em relação ao parâmetro teórico.

Figura 3. Sequência de nucleotídeos da serinoprotease clonada da glândula de *C. durissus collilineatus*, denominada Collineina-1, e predição da sequência de aminoácidos. A região codificante correspondente ao peptídeo sinal está indicada pela caixa e o pró-peptídeo está em negrito. O sítio teórico de glicosilação está marcado em cinza.

4.2. Clonagem da serinoprotease a partir da biblioteca de cDNA da glândula de *C. durissus collilineatus*

Os oligonucleotídeos específicos contendo sítios para as enzimas de restrição *Xho*I e *Not*II foram desenhados com base na sequência da serinoprotease obtida na biblioteca de cDNA de *C. d. collilineatus*. Os oligonucleotídeos utilizados para a subclonagem do cDNA que codifica a serinoprotease foram elaborados de forma a amplificar fragmentos sem a região que codifica o peptídeo sinal. Assim, o vetor foi digerido com a enzima de restrição *Xho*I, que cliva o sítio subjacente à região que codifica o peptídeo de secreção fator- α , permitindo que a proteína seja secretada com o peptídeo sinal do vetor. A abordagem que utiliza a secreção das proteínas heterólogas facilita a posterior purificação das mesmas, uma vez que *P.*

pastoris secreta baixos níveis de proteínas endógenas, e o meio de cultura utilizado não necessita da adição de suplementos proteicos (TSCHOPP et al., 1987; BARR et al., 1992).

Além disso, o cDNA amplificado contém uma região que codifica um sítio de clivagem para a enzima Kexina 2 (Kex2) na região amino-terminal da proteína. A enzima Kex2 consiste em uma serinoprotease que promove o processamento de pró-proteínas (ROCKWELL et al., 2002). A inclusão deste sítio de clivagem permite que a serinoprotease seja expressa sem nenhum resíduo de aminoácido adicional na região N-terminal, prevenindo qualquer prejuízo à função da molécula.

Após a reação de PCR, o fragmento resultante, correspondente ao cDNA que codifica a serinoprotease, foi eficientemente clonado, apresentando tamanho compatível com o esperado (743 pb) em gel de agarose 1% (Fig. 4).

Figura 4. Eletroforese em gel de agarose do cDNA correspondente à Collineina-1 amplificado por PCR. MM, Marcador Molecular Gene Ruler 1Kb (Fermentas – CA); SVSP-Cdc, cDNA correspondente à serinoprotease de *C. durissus collilineatus*. O fragmento correspondente ao tamanho esperado para a serinoprotease (743 pb) está indicado pela seta.

4.3. Expressão heteróloga e purificação da rCollineina-1

4.3.1. Construção do vetor de expressão pPICZ α A-Collineina1

O vetor de expressão no qual foi inserido o gene da Collineina-1 foi o pPICZ α A (Invitrogen). Este plasmídeo contém o gene *Sh ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (HIGGINS & CREGG, 1998; LIN-CEREGHINO & CREGG, 2000), que confere resistência à zeocina, permitindo a seleção de transformantes tanto na fase de amplificação do vetor em células de *Escherichia coli*, quanto na etapa de expressão de proteínas em *Pichia pastoris*. Além disto, a presença de um fragmento que codifica um peptídeo sinal de *Saccharomyces cerevisiae* (fator-alpha), composto por 89 resíduos de aminoácidos, localizado imediatamente após o promotor *AOXI*, permite o direcionamento da proteína recombinante através da via secretória da levedura (LAROCHE et al., 1994; CLARE et al., 1991; HIGGINS & CREGG., 1998; LIN-CEREGHINO & CREGG, 2000; CREGG et al., 2000).

Este vetor contém também múltiplos sítios de restrição para a inserção de genes heterólogo, além de sequência que codifica o epítipo *myc* na porção C-terminal para detecção de proteínas recombinantes por *Western blot*, seguido de uma cauda de seis resíduos de histidina, que facilita a purificação da proteína heteróloga por cromatografia de afinidade. Para garantir que a serinoprotease seja expressa contendo tanto o fator-alpha, quanto a cauda de poli-histidina, o cDNA foi amplificado sem os códons de início e término da tradução. As características deste vetor de expressão estão sumarizadas na figura 5.

Figura 5. Mapa do vetor de expressão pPICZα. A figura mostra a origem de replicação em *E. coli*, o fragmento contendo o promotor *AOX1* (5'*AOX1*), o fator de acoplamento alfa (α -factor), a região de sítios múltiplos de clonagem, a cauda de epítipo *myc* (*c-myc* epitope), a cauda de seis resíduos de histidina (6xHis), o fator de término de transcrição *AOX1* (*AOX1 TT*), o promotor de fator de alongamento de transcrição (*Ptef1* - *transcription elongation factor I*) e o fator de término de transcrição *CYC1* de *S. cerevisiae* (*CYC1 TT*). Fonte: www.invitrogen.com

O cDNA que codifica a serinoprotease, amplificado por PCR (descrito no item 4.2), foi purificado do gel de agarose para a remoção de enzimas e outras impurezas. O plasmídeo e o produto de PCR purificados foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *XhoI* e *NotI* para geração de extremidades adesivas complementares. Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose a 1% (Fig. 6) e purificados do gel como descrito anteriormente.

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da digestão do vetor e inserto com as enzimas de restrição *XhoI* e *NotI*. MM, marcador molecular Gene Ruler 1Kb (Fermentas – CA); 1, pPICZαA, vetor de expressão (3600 pb); 2, cDNA correspondente à serinoprotease de *C. d. collilineatus* (743 pb).

Os produtos de digestão purificados foram ligados por ação da enzima T4 DNA ligase. Para garantir o sucesso da ligação, foi utilizado um excesso de 10x do inserto em relação à concentração molar do plasmídeo, sendo que a proporção ideal para uma eficiente ligação foi determinada experimentalmente (dados não mostrados). A construção do vetor de expressão está esquematizada na figura 7.

Figura 7. Representação esquemática da construção do plasmídeo de expressão pPICZαA-Collineina1. attL1 e attL2, adaptadores; primer F, primer forward (oligonucleotídeo senso); primer R, primer reverse (oligonucleotídeos antissenso); α-factor, fator de acoplamento α; His-tag, cauda de poli-histidina. O cDNA que codifica a serinoprotease de *C. d. collilineatus* foi clonado e amplificado do vetor pDONR[™]222-SVSP por PCR. Os oligonucleotídeos utilizados contêm sítios de clivagem para as enzimas XhoI e Kex2 (senso) e NotI (antissenso). Os produtos das PCRs e o vetor de expressão pPICZαA (Invitrogen) foram submetidos à digestão com as enzimas XhoI e NotI para geração de extremidades adesivas complementares. A ligação do inserto ao vetor foi realizada por meio de reação com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen).

Após a reação de ligação, o vetor pPICZαA-Collineina1 foi utilizado para a transformação de células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes por choque térmico. As colônias transformadas foram cultivadas em meio contendo zeocina para a propagação do vetor. Os plasmídeos presentes nas colônias selecionadas por resistência à zeocina foram purificados por lise alcalina pela técnica de minipreparação (*miniprep*) (BIRNBOIM & DOLY, 1979).

A presença do inserto nas colônias selecionadas foi confirmada pela digestão do plasmídeo recombinante com as enzimas *XhoI* e *NotI*. Os seis clones submetidos à digestão foram analisados em gel de agarose 1%, sendo todas as colônias consideradas positivas para a presença do inserto, por apresentarem banda correspondente ao tamanho esperado para o gene da serinoprotease (743 pb) (Fig. 8).

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão do DNA plasmidial das colônias transformantes de *E. coli* com as enzimas de restrição *XhoI* e *NotI*. As colônias consideradas positivas apresentam bandas de DNA correspondentes ao vetor (3600 pb) e ao gene da SVSP (743 pb). MM, marcador molecular Gene Ruler 1Kb (Fermentas – CA); 1 a 6, DNA plasmidial digerido dos clones selecionados.

O DNA plasmidial das colônias positivas foram submetidos a sequenciamento com os oligonucleotídeos específicos para o vetor 5'AOX (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') e 3'AOX (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3), para a confirmação da correta ligação dos insertos. Os resultados dos sequenciamentos demonstraram que a fusão dos insertos no vetor ocorreu na fase de leitura correta, com a sequência do fator-alpha seguida dos sítios para *XhoI* e Kex2, o gene codificante da serinoprotease, seguido do sítio para *NotI*, epítipo *c-myc* e cauda de poli-histidina (Fig. 9).

Figura 9. Sequência de nucleotídeos do plasmídeo recombinante pPICZα-Collineina1. O gene da Collineina-1 está inserido subjacente ao fator-α, e apresenta um sítio de restrição para *XhoI* e um sítio de reconhecimento da enzima *Kex2*. O gene foi inserido no vetor de forma que a proteína seja expressa com epítipo *myc* e cauda de poli-histidina na porção C-terminal. Os códons que indicam o início e fim da transcrição estão em negrito. A região do inserto que codifica a Collineina-1 está marcada em cinza. Os sítios de clivagem para as enzimas de restrição estão marcados em azul. O sítio de clivagem para a protease *Kex2* está marcado em rosa. As regiões correspondentes ao anelamento dos oligonucleotídeos senso e antissenso estão sublinhadas.

4.3.2. Transformação das células de *P. pastoris*

As células da linhagem KM71H de *P. pastoris* foram transformadas via integração ao DNA cromossomal. Previamente à transformação, o vetor contendo o gene Collineina-1 foi linearizado com a enzima de restrição *SacI*, direcionando a integração ao locus *aox1::ARG4* do genoma de *P. pastoris*, por meio de recombinação homóloga entre as sequências

compartilhadas pelo vetor e o DNA da célula hospedeira, permitindo a geração de transformantes estáveis (CREGG et al., 1985, 1987; HIGGINS & CREGG., 1998; LIN-CEREGHINO & CREGG, 2000). A linearização do vetor foi visualizada em géis de agarose 1%, no qual foi possível identificar uma banda próxima ao tamanho esperado de 4350 pb (Fig. 10).

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pPICZαA-Collineina1 linearizado com a enzima de restrição *SacI*. MM, marcador molecular Gene Ruler 1Kb (Fermentas – CA); 1, plasmídeo pPICZαA-Collineina1 circular; 2, plasmídeo pPICZαA-Collineina1 linearizado com a enzima de restrição *SacI*.

A inserção de múltiplos genes em um único *locus* do DNA genômico da levedura consiste em um evento que ocorre espontaneamente nos *loci* *AOX1*, *his4* e *aox1::ARG4*, em uma frequência baixa, porém detectável (de 1 a 10% dos transformantes selecionados com zeocina), e geralmente resulta no aumento da taxa de expressão de proteínas (SREEKRISHNA et al., 1989; SCORER et al., 1994; HIGGINS & CREGG, 1998; LIN-CEREGHINO & CREGG, 2000; MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

A eletroporação resulta em uma das frequências de transformação mais altas para *P. pastoris*, e é o método de escolha para a seleção de colônias transformantes com integração de múltiplas cópias do gene heterólogo (LIN-CEREGHINO & LIN-CEREGHINO, 2007). Assim, células eletrocompetentes da linhagem KM71H de *P. pastoris* foram transformadas com o vetor linearizado pela técnica de eletroporação. Após a transformação, as células de *P. pastoris* foram cultivadas em meio contendo 500 µg/mL de zeocina para seleção de colônias recombinantes contendo múltiplas cópias do gene. Esta seleção resultou em 18 colônias

resistentes, que foram submetidas à PCR de colônias para a confirmação da integração do vetor ao DNA cromossomal.

Para o PCR de colônias, foi utilizado o oligonucleotídeo interno senso específico para a serinoprotease (descrito no item 3.2.) e oligonucleotídeo antissenso 3'AOX1 (Invitrogen). Todas as colônias analisadas foram positivas para a integração do vetor, apresentando bandas de DNA de aproximadamente 497 pb, correspondente ao tamanho esperado (Fig. 11). Estes dados demonstraram a presença do cassete de expressão em todas as colônias analisadas, comprovando a alta eficiência da integração do vetor ao DNA genômico da levedura. As colônias que resultaram em alta eficiência para a integração gênica foram selecionadas e utilizadas para a triagem de expressão da proteína recombinante.

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR das colônias de *P. pastoris* transformadas com o plasmídeo pPICZαA-Collina1. MM, marcador molecular Gene Ruler 1Kb (Fermentas – CA); 1 a 18, produtos de PCR das colônias selecionadas; Ctr-, controle negativo. O fragmento amplificado de tamanho próximo ao esperado (497 pb) está indicado pela seta.

A linhagem de células KM71H, utilizada na transformação com o plasmídeo recombinante, apresenta o gene cromossomal AOX1 amplamente corrompido e substituído pelo gene ARG4 de *S. cerevisiae* (*locus aox1::ARG4*) (CREGG & MADDEN, 1987). Como resultado, esta linhagem depende somente do gene que codifica a enzima álcool oxidase 2 (AOX2), que apresenta uma menor taxa de expressão. Desta forma, a cultura de células cresce em metanol em taxas mais lentas, o que caracteriza o fenótipo Mut^s de utilização de metanol. As linhagens Mut^s geralmente expressam altas taxas de proteína recombinante (HIGGINS & CREGG, 1998; LIN-CEREGRINO & LIN-CEREGRINO, 2007), além de necessitarem de menores taxas de metanol para a indução da expressão, o que pode representar uma vantagem

na utilização desta linhagem em fermentadores industriais, uma vez que o metanol é uma substância altamente inflamável (CREGG et al., 2000; LIN-CEREGHINO & LIN-CEREGHINO, 2007).

4.3.3. Expressão e Purificação da Collineina-1 recombinante

Com o objetivo de avaliar as colônias de *P. pastoris* que expressam a proteína recombinante em maior escala, foram realizadas triagens de expressão em placa para as colônias transformadas com o vetor pPICZαA-Collineina1. Para isso, oito colônias selecionadas em meio contendo 500 µg/mL de zeocina, e que possivelmente apresentam múltiplas cópias do gene, foram utilizadas para a expressão em baixa escala.

A expressão consistiu em duas etapas: a primeira etapa com o objetivo de gerar biomassa, na qual a cultura de células foi suprida de glicerol como fonte de carbono, e a segunda etapa que consiste na indução da expressão de proteínas pela adição de metanol ao meio. Após 96h de indução, o sobrenadante das culturas foi analisado em gel SDS-PAGE a 13,5%, corado com *Comassie Brilliant Blue*, para determinação dos níveis de expressão. Das oito colônias analisadas, todas expressaram a Collineina-1 recombinante (rCollineina-1) e a secretaram no meio de cultura na forma solúvel (Fig. 12). No entanto, a colônia de número 8 foi a que apresentou maior quantidade da proteína no sobrenadante, e por isso foi selecionada para os passos subsequentes de expressão.

Figura 12. Triagem da expressão da Collineina-1 recombinante em colônias de *P. pastoris* selecionadas por zeocina. Gel de poliacrilamida 13,5% corado com *Comassie Brilliant Blue* contendo o sobrenadante das culturas celulares após 96h de indução por metanol. Os números das colunas correspondem aos números das colônias. MM, marcador molecular (kDa); Ctr-, controle negativo (colônia transformada com vetor sem o inserto). A colônia 8 apresentou maior nível de expressão da proteína recombinante (indicada pela seta) e foi selecionada para os passos subsequentes de expressão.

A colônia 8 foi então submetida à triagem de condições ótimas de pH e composição do meio para a expressão da proteína recombinante. Para isso, foi realizada uma triagem em placa, assim como descrito anteriormente, porém com a diferença que na fase de indução as colônias foram cultivadas em meios com composição e pHs diferentes. As condições testadas foram: meio complexo tamponado BMMY (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1,34% YNB, 4×10^{-5} % biotina, 1% metanol, 100 mM fosfato de potássio), pHs 4,0, 6,0 e 7,0; meio mínimo tamponado BMM (1,34% YNB, 4×10^{-5} % biotina, 1% metanol, 100 mM fosfato de potássio), pHs 4,0, 6,0 e 7,0; e meio mínimo não tamponado MM (1,34% YNB, 4×10^{-5} biotina, 1% metanol).

Após 96h de indução da expressão de proteínas por metanol, as culturas foram centrifugadas e o conteúdo de proteínas do sobrenadante foi analisado por SDS-PAGE 13,5% corado com prata. Os maiores níveis de expressão da proteína recombinante foram atingidos em pH 7,0, sendo que em pH 4,0 não foi possível observar a presença da proteína recombinante no sobrenadante das culturas (Fig. 13).

As células de *P. pastoris* são capazes de sobreviver e crescer em uma faixa de pH relativamente ampla (pH 3,0 - 7,0), o que permite uma liberdade considerável em ajustar este

parâmetro no momento da indução. O pH do meio pode influenciar a expressão heteróloga por afetar a atividade de proteases secretadas, aumentando assim a estabilidade da proteína recombinante (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Em estudos prévios de otimização das condições de expressão de proteínas, foi determinado que a diminuição do pH do meio para 3,0 aumentou consideravelmente os níveis de expressão de um fator de crescimento insulina-simile e de um peptídeo bloqueador de aumento de citocina (BRIERLEY et al., 1994; KOGANESAWA et al., 2002). Apesar de não haver dados na literatura quanto à determinação do pH ótimo de indução de serinoproteases de peçonha de serpentes, existem relatos de expressão destas toxinas tanto em pH 5,0 (YOU et al., 2004) quanto em pH neutro (YU et al., 2007).

A estabilidade do produto pode ser influenciada também pela adição de suplementos ricos em aminoácidos no meio de cultura, possivelmente por competirem com substratos de proteases e inibirem a indução de proteases causada pela limitação de nitrogênio. (SREEKRISHNA et al., 1997; MACAULEY-PATRICK et al., 2005). No entanto, a adição de peptona e extrato de levedura ao meio de cultura não influenciou a estabilidade da Collineina-1 recombinante, uma vez que esta proteína é expressa em níveis semelhantes tanto em células cultivadas em meio mínimo quanto em meio complexo (Fig. 13).

Apesar de os suplementos adicionados ao meio providenciarem um ambiente químico ideal para o crescimento das células de *P. pastoris*, eles apresentam algumas limitações quanto à padronização de expressão em larga escala e fermentações industriais. Assim, muitas vezes é desejável a eliminação de componentes complexos do meio de forma a aumentar a reprodutibilidade e validar o processo de produção (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Diante disso, as condições escolhidas para a expressão da Collineina-1 em larga escala foi meio mínimo sem adição de peptona e extrato de levedura (BMM) em pH 7,0.

Figura 13. Triagem da expressão da Collineina-1 recombinante em diferentes condições de pH e composição do meio. Gel de poliacrilamida 13,5% corado com prata contendo o sobrenadante das culturas celulares após 96 h de indução por metanol. MM, marcador molecular (kDa); 1. meio BMMY pH 4,0; 2. meio BMMY pH 6,0; 3. meio BMMY pH 7,0; 4. meio BMM pH 4,0; 5. meio BMM pH 6,0; 6. meio BMM pH 7,0; 7. meio MM. A condição que resultou em maior nível de expressão da proteína recombinante (indicada pela seta) foi o meio BMM pH 7,0. Esta condição foi selecionada para a expressão da proteína em larga escala.

A Collineina-1 recombinante foi então expressa em larga escala nas condições escolhidas no processo de triagem em placas, para gerar proteína em quantidades suficientes para as caracterizações estruturais e funcionais. Após 96 h de indução, a cultura foi centrifugada e o sobrenadante foi separado, filtrado e utilizado para a purificação da proteína recombinante.

A Collineina-1 foi clonada no vetor de forma a possibilitar sua expressão com uma cauda de poli-histidina da região C-terminal da molécula, facilitando assim a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade a metais imobilizados (IMAC - *Immobilized-Metal Affinity Chromatography*). Desta forma, o sobrenadante foi primeiramente submetido à cromatografia de afinidade a níquel utilizando a resina Ni-NTA Agarose (Qiagen - DE). Contudo, a proteína não interagiu com a resina, impossibilitando a purificação da Collineina-1 recombinante por este método de purificação (dados não mostrados). A incapacidade da proteína recombinante em interagir com a coluna de níquel pode ser explicada pelas seguintes hipóteses: (i) a cauda de poli-histidina pode estar localizada no interior da molécula enovelada, estando assim indisponível para a ligação com a resina; (ii) a cauda de poli-histidina pode ter sido clivada por ação proteolítica de enzimas secretadas pela

P. pastoris; ou (iii) a cauda de poli-histidina pode ter sido clivada por autoproteólise da proteína recombinante. No entanto, para elucidar os motivos pelos quais a proteína não interagiu com a coluna, será necessária uma caracterização estrutural detalhada da molécula.

Diante da impossibilidade de purificar a Collineina-1 recombinante em um único passo por IMAC, foi padronizado um protocolo de purificação baseado na combinação de técnicas cromatográficas de troca iônica e fase reversa. Previamente à purificação, 100 mL do sobrenadante foi inicialmente concentrado e tratado com 7 M de ureia, com o objetivo de remover qualquer molécula agregada à proteína recombinante. Após este tratamento, o sobrenadante foi aplicado em coluna de troca iônica MonoQ. A eluição foi realizada com gradiente descontínuo até 1 M de NaCl, resultando em oito principais frações (Fig. 14). A fração 6 apresentou maior atividade coagulante e foi então submetida à cromatografia de fase reversa em coluna C4. Os componentes da amostra foram eluídos por gradiente linear de solução B, resultando em um único pico (Fig. 15). A simetria do pico cromatográfico da fase reversa e o perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Fig. 15) indicam que a proteína é obtida com alto grau de pureza após os dois passos cromatográficos, demonstrando a eficiência do protocolo de purificação utilizado.

Os cálculos de recuperação para este processo de purificação são apresentados na tabela 3. Estes dados demonstram que a expressão da Collineina-1 recombinante apresenta um rendimento de 56 mg de proteína por litro de cultura nas condições padronizadas, e que o método de purificação utilizado resulta em uma alta recuperação da atividade esterásica da proteína recombinante, mesmo após o tratamento com ureia.

Figura 14. Perfil cromatográfico do fracionamento das proteínas presentes no meio de cultura em coluna de troca iônica MonoQ. A cromatografia foi realizada em sistema FPLC Äkta Purifier UPC10. Após 96 h de indução, a cultura foi centrifugada a 10.000 $\times g$ por 10 min, e o sobrenadante foi separado, filtrado, concentrado e incubado com tampão Tris-HCl 0,02M pH 8,0, contendo 7 M de ureia, em uma proporção de 1:5 (v/v), por 90 min, à temperatura ambiente. Após a incubação, o meio foi aplicado em coluna de troca iônica MonoQ 5/50 (5 x 50 mm, GE Healthcare), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02, M pH 8,0. A eluição foi realizada com gradiente descontinuo até 1 M de NaCl, a uma vazão de 1 mL/min, coletando 0,5 mL por tubo.

Figura 15. Perfil cromatográfico da rCollineina-1 em coluna de fase reversa C4. A cromatografia foi realizada em sistema FPLC Äkta Purifier UPC10 em coluna C4 (0,46 x 25 cm, partícula de 5 μ m, Shodex), pré-equilibrada com o solvente A (0,1% de ácido trifluoroacético). Para a eluição dos componentes da amostra, foi utilizado gradiente linear até uma concentração de 100% de solução B (0,1% de ácido trifluoroacético e 80% de acetonitrila), a uma vazão de 0,8 ml/min, coletando 0,5 mL por tubo. Quadro inserido: SDS-PAGE 13,5%. (MM) marcador molecular; (1) meio de cultura concentrado; (2) fração 6 da troca iônica em coluna MonoQ; (3) rCollineina-1 eluída da fase reversa em coluna C4 (indicada pela seta).

TABELA 3 - Recuperação e atividade específica dos passos de purificação da Collineina-1 recombinante, partindo de 100 mL de meio de cultura.

Passo cromatográfico	Proteína		Atividade Enzimática			
	Massa (mg)	Recuperação (%)	Específica (U/mg)	Total (U)	Recuperação (%)	Fator de purificação
Meio de cultura	60,00	100,00	5.950	357.000	100,0	1,00
MonoQ	5,80	9,70	9.950	57.710	16,16	1,67
C4	5,60	9,33	9.810	54.936	15,38	1,65

* Uma unidade de atividade amidolítica sobre o substrato TAME (U) foi definida como o aumento de 0,01 unidade de absorância espectrofotométrica a 247 nm.

Trabalhos de expressão de SVSPs em sistema de *P. pastoris* relatam rendimentos variáveis para esta classe de proteínas em meio de cultura. A batroxobina de *Bothrops atrox* e a alfofibrase de *Trimeresurus albolabris* são expressas na proporção de 10 mg/L (LI et al., 2007) e 660 µg/L (MUANPASITPORN & ROJNUCKARIN, 2007), respectivamente, enquanto a calobina de *Agkistrodon caliginosus* atinge um rendimento de 3,5 g/L (YUAN et al., 2009).

Na tentativa de aumentar os níveis de expressão e aprimorar a recuperação da atividade das SVSPs recombinantes, diversos trabalhos utilizaram a estratégia de coexpressão da proteína de interesse com moléculas que auxiliam o enovelamento protéico. A ancrod de *Calloselasma rhodostoma*, por exemplo, apresenta um aumento expressivo na taxa de expressão quando acoplada a uma isomerase de pontes dissulfeto de *P. pastoris* (PpPDI), chegando a render 315 mg/L (ZHANG et al., 2011b). Outro caso no qual a expressão de uma SVSP fusionada a uma chaperona resultou em altos níveis de expressão em *P. pastoris* é o da glosedobina de *Gloydius shedaoensis*, que quando acoplada à Hsp70, apresenta rendimento de 44,5 mg/L (YANG et al., 2009).

Apesar de nenhuma técnica de aumento de expressão ter sido adotada como estratégia inicial deste trabalho, o rendimento da rCollineina-1 é compatível com dados presentes na literatura, e não diverge significativamente dos rendimentos obtidos pelo acoplamento das SVSPs recombinantes a proteínas que auxiliam o enovelamento protéico.

P. pastoris é o sistema eucarioto de expressão mais produtivo dentre os sistemas disponíveis atualmente e tem sido utilizado na produção de uma diversidade de proteínas heterólogas na forma solúvel, as quais são facilmente secretadas para o meio de cultura. Além disso, este organismo tem a capacidade de promover o correto processamento e enovelamento da molécula recombinante, além de muitas das modificações pós-traducionais realizadas por eucariotos superiores, o que permite a expressão de proteínas na forma biologicamente ativa, dispensando assim etapas adicionais de renaturação da molécula.

A grande diversidade de promotores, sinais de secreção e linhagens disponíveis para expressão em *P. pastoris*, aliada aos métodos desenvolvidos com o intuito de aprimorar os níveis de expressão, tem fornecido subsídios para o sucesso na expressão de proteínas com diversos graus de complexidade. No entanto, apesar do sistema de expressão em *P. pastoris* ser de fácil manipulação e apresentar protocolos de produção bem definidos, são necessários alguns passos de aprimoramento do método de produção, de forma a atingir um maior rendimento da proteína heteróloga.

Ao longo dos últimos anos, o número de publicações que utilizam o sistema de *P. pastoris* com a finalidade de produção de moléculas para pesquisa tem aumentado rapidamente. Isto se reflete no aumento do uso deste sistema para a produção industrial de proteínas como uma alternativa para métodos mais tradicionalmente empregados, como *E. coli* e *S. cerevisiae*. Dentro deste contexto, a padronização de um método eficaz de produção heteróloga da serinoprotease em *P. pastoris* permite, não somente o aprofundamento da caracterização funcional da proteína recombinante, como também pode gerar perspectivas para a aplicação destas enzimas em diagnósticos clínicos ou como agentes terapêuticos no tratamento de desordens hemostáticas.

4.4. Purificação da serinoprotease da peçonha de *C. durissus collilineatus*

A purificação da serinoprotease de interesse a partir da peçonha bruta de *C. d. collilineatus* foi realizada pela combinação de três etapas cromatográficas. Na primeira etapa de purificação, 50 mg da peçonha bruta foram aplicados em coluna de exclusão molecular Sephacryl-S100, resultando na eluição de cinco frações (Fig. 16). Amostras das frações foram avaliadas quanto à atividade coagulante, sendo que a fração S3 apresentou a maior atividade. Esta fração foi então concentrada, diluída no tampão da corrida, e aplicada em coluna de troca iônica MonoQ 5/50 GL. Este procedimento cromatográfico resultou em sete principais frações (Fig. 17), as quais foram avaliadas quanto à atividade coagulante. A fração denominada Q4 apresentou a maior atividade coagulante, sendo então dessalinizada, liofilizada e utilizada no passo cromatográfico seguinte.

O refinamento da purificação da serinoprotease foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna de fase reversa C4, pré-equilibrada com a solução A. A eluição resultou em dois picos cromatográficos (Fig. 18), ambos apresentando a capacidade de coagular o plasma. A pureza das proteínas foi verificada por simetria do pico cromatográfico e perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) corado com prata (gel inserido na Fig. 18). Estes resultados demonstraram que o protocolo apresentado no presente trabalho resultou na obtenção de duas isoformas de serinoprotease da peçonha de *C. d. collilineatus* com elevado teor de pureza. A serinoprotease purificada no pico 1 foi denominada Collineina-1, e a correspondente ao pico 2 foi denominada Collineina-2. A identificação da serinoprotease nativa que corresponde à proteína recombinante foi determinada nos passos seguintes de sequenciamento *de novo* por espectrometria de massas.

Figura 16. Perfil cromatográfico do fracionamento da peçonha bruta de *C. d. collilineatus* por filtração molecular em coluna Sephacryl S-100. A peçonha (50 mg) foi dispersa em tampão formiato de amônia 0,05 M, pH 3,5, centrifugada a 13000 $\times g$ por 10 min, e o sobrenadante foi aplicado à coluna de gel filtração Sephacryl S100 HR (1,6 x 60 cm), pré-equilibrada com o mesmo tampão. A cromatografia foi realizada em sistema FPLC Äkta Purifier UPC10 com leitor de UV a 280 nm, a uma vazão de 0,5 mL/min, coletando 1,0 mL por tubo. A fração que apresentou maior atividade coagulante está indicada pela seta.

Os cálculos de rendimento da Collineina-1 para este processo de purificação são apresentados na tabela 4. Estes dados demonstram que esta serinoprotease está presente na peçonha de *C. d. collilineatus* em baixas concentrações, representando apenas 0,63% do total de toxinas. Boldrini-França e colaboradores (2010) determinaram uma concentração relativa de serinoproteases entre 0,5% e 1,9% no proteoma da peçonha de *C. d. collilineatus*. Estes dados são compatíveis com os rendimentos apresentados neste trabalho, indicando que não houve perda significativa de proteína durante o processo de isolamento. Além disso, a atividade específica da peçonha solúvel foi de 2.440 U/mg, contra 9.100 U/mg para a Collineina-1, o que representa um fator de purificação de 3,72 da atividade enzimática, mesmo após exposição a solventes orgânicos e a condições de pH ácido.

Figura 17. Perfil cromatográfico da fração S3 em coluna de troca iônica MonoQ. A fração S3 obtida da filtração molecular da peçonha bruta foi aplicada à coluna troca iônica MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare – UK), de dimensões 5 x 50 mm, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0. A eluição foi realizada com gradiente descontínuo até 1 M de NaCl, a uma vazão de 1 mL/min, coletando 0,5 mL por tubo. A cromatografia foi realizada em sistema FPLC Äkta Purifier UPC10, com leitor de UV a 280 nm. A fração que apresentou maior atividade coagulante está indicada pela seta.

As serinoproteases estão presentes na peçonha da maioria das serpentes pertencentes às famílias Viperidae, Elapidae, Crotalidae e Colubridae (CASTRO et al., 2004). Nos últimos anos, diversos estudos de purificação, caracterização e clonagem e expressão de SVSPs vêm levando ao conhecimento de um grande número de toxinas desta classe. Como resultado, vários métodos de purificação de serinoproteases de peçonha de serpentes vêm sendo descritos na literatura, sendo que a maioria baseia-se na combinação de fracionamentos por gel filtração, seguido por cromatografias de troca-iônica ou afinidade (SERRANO & MAROUN, 2005).

Figura 18. Perfil cromatográfico da fração Q4 em coluna de fase reversa C4. A cromatografia foi realizada em sistema FPLC Äkta Purifier UPC10 em coluna C4 (0,46 x 25 cm, partícula de 5 μ m, Shodex), pré-equilibrada com o solvente A (0,1% de ácido trifluoroacético). Para a eluição dos componentes da amostra, foi utilizado gradiente segmentado até uma concentração de 100% de solução B (0,1% de ácido trifluoroacético e 80% de acetonitrila), a uma vazão de 0,8 ml/min, coletando 0,5 mL por tubo. Quadro inserido: SDS-PAGE 13,5% corado com prata das duas isoformas de serinoprotease purificadas. (MM) marcador molecular; (1) pico 1 (Collineina-1) (2) pico 2 (Collineina-2).

TABELA 4 - Recuperação e atividade específica dos passos de purificação das isoformas de serinoprotease da peçonha de *C. d. collilineatus*.

Passo cromatográfico	Proteína		Atividade Enzimática			
	Massa (mg)	Recuperação (%)	Específica (U/mg)	Total (U)	Recuperação (%)	Fator de purificação
Peçonha bruta	50,00	100,00	2,440	122,000	100,0	1,00
Sephacryl S-100	2,50	5,00	5,3100	13,275	10,8	2,17
MonoQ	0,55	1,10	9,150	5,052	4,1	3,75
C4	0,31	0,63	9,100	2,848	2,3	3,72

* Uma unidade de atividade amidolítica sobre o substrato TAME (U) foi definida como o aumento de 0,01 unidade de absorbância espectrofotométrica a 247 nm.

Embora mais raramente, a cromatografia de fase reversa é utilizada em alguns trabalhos tanto para a purificação das SVSPs em uma única etapa (VILCA-QUISPE et al., 2010), quanto associada a outros métodos cromatográficos para o refinamento da purificação (HUNG & CHIOU, 1994; ALEXANDER et al., 1998; SERRANO et al., 1998; AMICONI et al., 2000; WANG et al., 2001; JIN et al. 2005). Muitas classes de proteínas são suscetíveis à desnaturação irreversível quando expostas a solventes orgânicos, como a acetonitrila. No entanto, as SVSPs apresentam alta resistência à acetonitrila, e retém grande parte de sua atividade após a cromatografia de fase reversa.

Serrano e colaboradores (2000) demonstraram que três isoformas de serinoproteases isoladas da peçonha de *B. jararaca*, retiveram cerca de 85% de suas atividades, mesmo após serem submetidas à cromatografia de fase reversa. Muitos outros trabalhos, apesar de não apresentarem dados de rendimento da atividade das SVSPs após os passos cromatográficos, recuperaram as SVSPs com alta atividade após a utilização de RP-HPLC no processo de purificação destas toxinas (PONCE-SOTO et al., 2007; MENALDO et al., 2012; VALERIANO-ZAPANA et al., 2012).

Apesar do grande número de trabalhos relacionados à purificação de SVSPs existentes na literatura, as serpentes crotálicas brasileiras ainda são pouco estudadas em relação a essa classe de toxinas. Isso provavelmente se deve ao fato das serinoproteases estarem presentes nessas peçonhas em baixas concentrações, o que dificulta a purificação e obtenção dessas proteínas em quantidades suficientes para uma caracterização mais aprofundada.

A serinoprotease mais estudada de serpentes brasileiras do gênero *Crotalus* é a giroxina, purificada da peçonha de *C. d. terrificus*. Barros e colaboradores (2011) purificaram a giroxina pela combinação de dois passos cromatográficos. O primeiro passo foi realizado por gel filtração em coluna Sephadex G75, seguido de uma cromatografia de afinidade em coluna Benzamidina Sepharose. Esse método foi testado no presente estudo para a purificação da serinoprotease de interesse, mas não permitiu a separação das isoformas presentes na peçonha, resultando em uma fração com baixo grau de pureza (resultados não mostrados).

Oliveira e colaboradores (2009) isolaram uma serinoprotease de *C. d. terrificus* e uma de *C. d. collilineatus* por meio de dois passos cromatográficos, baseados em um gel filtração em Sephadex G-75 e uma troca iônica em coluna ES-502N. Da mesma forma, a metodologia utilizada no presente trabalho utilizou como primeiros passos de fracionamento uma gel filtração seguida de uma troca iônica, mas somente esses dois processos não permitiram a obtenção das isoformas com alto grau de pureza. Assim, para a separação das duas isoformas

presentes na peçonha de *C. d. collilineatus* foram necessários três passos cromatográficos, sendo que o passo final consiste na separação de proteínas em coluna de fase reversa.

As serinoproteases de peçonha de serpentes estão em um processo evolutivo que resulta na formação de isoformas e na geração da diversidade funcional dessas toxinas (MACKESSY, 2010). Vários estudos na literatura descrevem a presença de isoformas de serinoproteases em diversas peçonhas de serpentes, sendo que a separação de proteínas por cromatografia de fase reversa é, muitas vezes, determinante para o isolamento dessas isoenzimas. Hung e Chiou (1994), por exemplo, isolaram três isoformas de uma α -fibrinogenase da peçonha de *C. atrox*, com massas que variam de 33 a 35 kDa. Menaldo e colaboradores (2012) isolaram duas isoformas de massas distintas (27 e 41 kDa) da peçonha de *Bothrops pirajai*, que apresentaram atividades divergentes sobre o fibrinogênio. Em 2000, Petretski e colaboradores isolaram duas enzimas trombina-simile de massas próximas a 38 kDa a partir da peçonha de *B. atrox*. As serinoproteases purificadas no presente estudo apresentam massas molares semelhantes em SDS-PAGE (aproximadamente 32 kDa), apesar de que a Collineina-2 aparenta ter massa ligeiramente inferior à da Collineina-1. Para uma determinação da massa molar mais precisa, as proteínas íntegras foram submetidas a análises por espectrometria de massas.

4.5. Caracterização estrutural das serinoproteases nativas e recombinante

As duas isoformas nativas e a forma recombinante das serinoproteases foram analisadas quanto à massa molar e estrutura primária por técnicas de espectrometria de massas. Para a determinação das massas molares, as proteínas íntegras foram aplicadas em espectrômetro de massas nanoESI-Q/TOF. A massa molar foi calculada pela deconvolução dos dados da relação massa/carga, obtidos para os íons multicarregados. Dessa forma, foram determinadas as massas de 29.475 Da para a Collineina-1, 29.388 Da para a Collineina-2 (Fig. 19) e 28.868 Da para a Collineina-1 recombinante (Fig. 20). Nos espectros de massas obtidos, é possível observar a presença de alguns picos de menor intensidade e massas próximas à massa correspondente ao espectro de maior intensidade. Estas observações são mais expressivas no espectro da Collineina-1 recombinante, que exhibe diversos picos com diferenças de massas de 87 e 162 Da. Interessantemente, estas diferenças correspondem à massa isotópica da Serina e à perda neutra de hexose, respectivamente. Diante disso, pode-se supor que (i) a proteína sofre fragmentação durante o processo de ionização, o que leva à perda de uma hexose e de uma serina (que corresponde ao resíduo presente na extremidade C-

terminal da molécula), ou (ii) a proteína é expressa pela *P. pastoris* com padrões diversos de glicosilação e sofre ações proteolíticas que podem levar à perda de um resíduo de serina.

A **B**

Figura 19. Espectro de massas da Collineina-1 (A) e Collineina-2 (B). A massa molar das proteínas foi determinada por espectrometria de massas no modo MS/MS em aparelho Synapt G2-S (Waters - UK) com ionização por nano-eletrospray (nano-ESI). A massa molar foi calculada pela deconvolução dos dados da relação massa/carga, obtidos para os íons multicarregados.

Figura 20. Espectro de massas da Collineina-1 recombinante. A massa molar da proteína foi determinada por espectrometria de massas no modo MS/MS em aparelho Synapt G2-S (Waters - UK) com ionização por nano-eletrospray (nano-ESI). A massa molar foi calculada pela deconvolução dos dados da relação massa/carga, obtidos para os íons multicarregados.

Para a identificação da proteína nativa isolada que corresponde à Collineina-1 recombinante, foram utilizadas técnicas de sequenciamento amino-terminal, sequenciamento *de novo* de peptídeos tripsínicos e *mass fingerprinting*, com o objetivo de elucidar a sequência de aminoácidos das serinoproteases obtidas nesse trabalho. Com a associação destas técnicas, foi possível a identificação de 140 resíduos para a Collineina-1 recombinante, 164 resíduos para a Collineina-1 nativa e 89 para a Collineina-2. A sequência de aminoácidos deduzida para a proteína recombinante, descrita no item 4.1 deste capítulo, foi utilizada no alinhamento múltiplo das sequências parciais obtidas para prever as prováveis posições dos peptídeos tripsínicos (Fig. 21).

A partir do alinhamento múltiplo das sequências, foi possível determinar 100% de identidade dos aminoácidos obtidos para a Collineina-1 nativa e recombinante, em relação à sequência deduzida. Apesar de não ter sido possível realizar o sequenciamento completo das proteínas, pode-se presumir que a proteína recombinante corresponde à Collineina-1 nativa. Por outro lado, a sequência parcial da Collineina-2 apresentou uma substituição conservativa na posição 64 e quatro substituições não conservativas nas posições 115, 156, 159 e 181 quando comparada com as sequências da Collineina-1 nas formas nativa e recombinante, o que indica que estas toxinas podem apresentar características estruturais e funcionais distintas.

Figura 21. Alinhamento múltiplo entre as sequências parciais de aminoácidos das serinoproteases nativas e recombinante e a sequência deduzida da Collineina-1. O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado com auxílio do algoritmo MultiAlin (CORPET, 1988). Caixas pretas representam os aminoácidos conservados em todas as sequências. Aminoácidos em preto são conservados em pelo menos duas sequências. Aminoácidos em cinza correspondem aos resíduos não conservados.

Nas análises *in silico*, descritas no item 4.1 deste capítulo, foi determinada uma massa teórica de 26638,3 Da para a sequência deduzida da Collineina-1. No entanto, a massa da proteína nativa determinada por espectrometria de massas foi de 29474 Da, representando uma diferença de 2835,7 Da entre as massas teórica e experimental. Essa diferença de massas pode ser explicada pela presença de N-glicosilações ligadas ao sítio localizado na posição 81 dessas moléculas. É válido ressaltar também que as serinoproteases de peçonha de serpentes podem apresentar O-glicosilações (SERRANO E MAROUN, 2005), mas devido à ausência de sequência consenso, não é possível presumir a adição de carboidratos por ligações O-glicosídicas na proteína (APWEILER et al., 1999).

Por outro lado, era esperada uma massa molar superior para a Collineina-1 recombinante em relação à massa da proteína nativa, uma vez que esta molécula foi expressa com cauda poli-histidínica e epítipo *C-myc* na porção C-terminal, além de estar sujeita à hiperglicosilação promovida pela *P. pastoris*. A massa teórica determinada para a enzima recombinante é de 29690 Da, sendo que a massa obtida experimentalmente é de 28868 Da. Este fato comprova que a rCollineina-1 é obtida do sobrenadante da cultura de *P. pastoris* na forma truncada devido à ação proteolítica de enzimas secretadas pelo organismo heterólogo ou então da própria serinoprotease. Porém, essas observações não fornecem evidências da presença de glicosilações na proteína recombinante.

As SVSPs são geralmente glicoproteínas e apresentam conteúdos variáveis de N e O-glicosilações ligadas à molécula em posições não homólogas, o que pode gerar uma variação na massa dessas proteínas de até 40 kDa (SERRANO E MAROUN., 2005). A composição dos carboidratos presentes nas SVSPs é variável e ainda não há dados suficientes para estabelecer uma correlação entre a classificação taxonômica das serpentes e a estrutura dos oligossacarídeos ligados às serinoproteases (LIN et al., 2011).

Dentre os carboidratos previamente identificados nas SVSPs estão a fucose, hexose, ácido siálico, N-acetilglicosamina (GlcNAc), manose e ácido N-acetilneuramínico (NauAc) (PIRKLE, 1998; KOH et al., 2001; WANG et al, 2001; BORTOLETO et al., 2002; OYAMA & TAKAHASHI, 2003; COSTA et al., 2009; LIN et al., 2011). Até o momento, a importância do motivo carboidrato na relação estrutura-função das SVSPs não foi completamente elucidada. No entanto, há evidências de que as glicanas conferem estabilidade às serinoproteases e, em alguns casos, podem influenciar o reconhecimento de substratos e a acessibilidade ao sítio ativo (OYAMA & TAKAHASHI, 2003; SERRANO E MAROUN, 2005; SILVA-JUNIOR et al., 2007). Em um estudo recente, Mukherjee e Mackessy (2013) demonstraram que a glicosilação de uma serinoprotease isolada da peçonha de *Daboia russelii russelii*, denominada Russelobina, confere resistência à ação de inibidores fisiológicos, como α 2-MG e antitrombina-III, aumentando a estabilidade da enzima no organismo da vítima.

Com o objetivo de avaliar a conservação de resíduos de aminoácidos em regiões importantes para a atividade catalítica da Collineina-1, assim como em regiões secundárias da molécula, a sequência deduzida da serinoprotease foi alinhada com outras SVSPs de alta identidade, presentes em bancos de dados. O alinhamento múltiplo da sequência deduzida da Collineina-1 indica uma semelhança estrutural com outras serinoproteases de peçonha de serpente (Fig. 22). As porcentagens de identidades entre as sequências de aminoácidos das proteínas alinhadas variam de 99 a 77%, sendo que cinco das seis pontes dissulfeto intramoleculares existentes nas SVSPs são altamente conservadas, o que pode refletir na preservação da estrutura tridimensional destas moléculas. A sexta ponte dissulfeto, formada pelos resíduos Cys88 e Cys235 (posições relativas à Collineina-1), é característica das SVSPs, estando ausente das tripsinas. Esta ponte dissulfeto conecta a extensão C-terminal da molécula, formando uma alça que restringe a entrada na fenda do sítio ativo, o que pode estar relacionado com diferenças de especificidade destas enzimas por certos substratos (PARRY et al., 1998; SERRANO & MAROUN, 2005).

Collineina-1_Cdc	VIGGDECNINEHNFVALYEWYSQSFCLCGGTLLINGEWVLTAAHCDRKHILIYVGVDHRSV	60
B2.1_Cdt	VIGGDECNINEHNFVALYEWYSQSFCLCGGTLLINGEWVLTAAHCDRKHILIYVGVDHRSV	60
B1.3_Cdt	VIGGDECNINEHNFVALYEWYSQSFCLCGGTLLINGEWVLTAAHCDRKHILIYVGVDHRSV	60
B1.4_Cdt	VIGGDECNINEHNFVALYEWYSQSFCLCGGTLLINGEWVLTAAHCDRTHFLIYVGVDHRSV	60
Crotalase_Ca	VIGGDECNINEHNFVALYDYWSQSFCLCGGTLLINEEWVLTAAHCDRTHILIYVGVDHRSV	60
SP5_Ca	VIGGDECNIDEHRFLVALYHSRSKTFCLCGGTLLNEEWVLTAAHCNRVFMYIRLGMHNKNV	60
SP9_Ca	VIGGDECNIDEHRFLVALYHSRSKTFCLCGGTLLNEEWVLTAAHCNRVFMYIRLGMHNKNV	60
SP6_Sce	VIGGDECNINEHNFVALYHSRSKTFCLCGGTLLNEEWVLTAAHCNRVFLYIRLGMHNKNV	60
Bilineobina_Ab	IIGGDECNINEHNFVALYDVWSGSFCLCGGTLLINQEWVLTAAHCNMSNIYIYLGHNQSV	60
Stejnobina_Vs	VIGGDECNINEHNFVALYDFWSGDFCLCGGTLLINQEVLTAAHCKTRNMYIYLGHNKSV	60
	:*****:..*****. * *****.* *.**** ** . : * :*:..*	
Collineina-1_Cdc	QFDKEQRRFPKEKYFFNCRNFTKWKDKIMLIRLNKPVSYSSEHIAPLSLPSSPPIVGSVC	120
B2.1_Cdt	QFDKEQRRFPKEKYFFNCRNFTKWKDKIMLIRLNKPVSYSSEHIAPLSLPSSPPIVGSVC	120
B1.3_Cdt	QFDKEQRRFPKEKYFFNCRNFTKWKDKIMLIRLNKPVSYSSEHIAPLSLPSSPPIVGSVC	120
B1.4_Cdt	QFDKEQRRFPKEKYFFNCGNFTKWKDKIMLIRLNKPVRNNEHIAPLSLPSSPPSVGSVC	120
Crotalase_Ca	QFDKEQRRFPKEKYFFDCSNFTKWKDKIMLIRLNKPVSYSSEHIAPLSLPSSPPIVGSVC	120
SP5_Ca	KFDDEQIRYAKEKYFFRCHNFTKWKDKIMLIRLNKPVSYSSEHIAPLSLPSSPPIVGSVC	120
SP9_Ca	KFDDEQIRYAKEKYFFRCHNFTKWKDKIMLIRLNKPVSYSSEHIAPLSLPSSPPIVGSVC	120
SP6_Sce	NFDDQRRYPKKKYFFRCHNFTKWKDKIMLIRLNKPVSYSSEHIAPLSLPSSPPIVGSVC	120
Bilineobina_Ab	QFDDEERRYPEKYLFRCCKNFTKWKDKIMLIRLNKPVRNNEHIAPLSLPSSPPIVGSVC	120
Stejnobina_Vs	QFDDEQRRYPKKKYFFRCHNFTKWKDKIMLIRLNKPVRNSAHIAPLSLPSSPPIVGSVC	120
	:*.:* :*.*:*** * :***: *****.* * . ***** ** *	
Collineina-1_Cdc	RVMGWGTIKSPQETLPDVPHCANINLLDYEVCRTHAHPQFRLPATSRILCAGVLEGGIDTC	180
B2.1_Cdt	RVMGWGTIKSPQETLPDVPHCANINLLDYGVCRTHAHPQFRLPATSRILCAGVLEGGIDTC	180
B1.3_Cdt	RVMGWGTIKSPQETLPDVPHCANINLLDYEVCRTHAHPQFRLPATSRILCAGVLEGGIDTC	180
B1.4_Cdt	RVMGWGQTTSPQNTLPDVPHCANINLLDYEVCRTHAHPQFRLPATSRILCAGVLEGGIDTC	180
Crotalase_Ca	RAMGWGQTTSPQETLPDVPHCANINLLDYEVCRTHAHPQFRLPATSRILCAGVLEGGIDTC	180
SP5_Ca	RAMGWGQTTSPQETLPDVPHCANINLLDYEVCRTHAHPQFRLPATSRILCAGVLEGGIDTC	180
SP9_Ca	RAMGWGQTTSPQETLPDVPHCANINLLDYEVCRTHAHPQFRLPATSRILCAGVLEGGIDTC	180
SP6_Sce	RAMGWGQTTSPQETLPDVPHCANINLLDYEVCRTHAHPQFRLPATSRILCAGVLEGGIDTC	180
Bilineobina_Ab	RVMGWGTITSPNETLPDVPRCVNINLFNYTVCRGVFP--RLPERSRILCAGVLEGGIDTC	178
Stejnobina_Vs	RVMGWGTITSPNETLPDVPRCANINLFNYTVCHGVFP--WLPARSRILCAGVLEGGIDTC	178
	*.**** .*:*****.* *****.* ** : . * ** * *****.* *****	
Collineina-1_Cdc	HRDSGGPLICNGEFQGVISWGDGSCAQPDKPKALYSKVFHDLDWIQNIAGSETVNCPS	238
B2.1_Cdt	HRDSGGPLICNGEFQGVISWGDGSCAQPDKPKALYSKVFHDLDWIQNIAGSETVNCPS	238
B1.3_Cdt	HRDSGGPLICNGEFQGVISWGDGSCAQPDKPKALYSKVFHDLDWIQNIAGSETVNCPS	238
B1.4_Cdt	NRDSGGPLICNGEFQGVISWGDGSCAQPDKPKALYSKVFHDLDWIQSIAGNTTVNCPP	238
Crotalase_Ca	NRDSGGPLICNGEFQGVISWGDGSCAQPDKPKALYSKVFHDLDWIQSIAGNTTVNCPP	238
SP5_Ca	NRDSGGPLICNGEFQGVISWGDGSCAQPDKPKALYSKVFHDLDWIQSIAGNTTVNCPP	238
SP9_Ca	NRDSGGPLICNGEFQGVISWGDGSCAQPDKPKALYSKVFHDLDWIQSIAGNTTVNCPP	238
SP6_Sce	HRDSGGPLICNGEFQGVISWGDGSCAQPDKPKALYSKVFHDLDWIQNIAGNTTVNCPP	238
Bilineobina_Ab	KRDSGGPLICNGEFQGVISWGFKRCAPRKPKALYSKVFHDLDWIQSIAGNTTVNCPP	235
Stejnobina_Vs	KRDSGGPLICNGEFQGVISWGFKRCAPRKPKALYSKVFHDLDWIQSIAGNTTVTCPP	236
	:*****:***** ** *****.**:*****.* ***** .*. *	

Figura 22. Alinhamento múltiplo da sequência da Collineina-1 com outras serinoproteases de peçonha de serpentes. A sequência deduzida da Collineina-1 foi alinhada com nove SVSPs presentes no banco de dados GenBank, com o auxílio do algoritmo online ClustalW2. Os resíduos marcados em preto compõem a tríade catalítica His42, Asp87 e Ser184. Os resíduos marcados em cinza correspondem às regiões de reconhecimento de substratos. Resíduos marcados pela caixa correspondem ao sítio teórico de glicosilação. Os símbolos indicam os resíduos Cys conservados. Resíduos de Cys que apresentam o mesmo símbolo representam pares na formação de pontes dissulfeto intramoleculares. As sequências foram nomeadas com os nomes das enzimas e a espécie às quais pertencem: (Cdc) *Crotalus durissus collilineatus*, (Cdt) *Crotalus durissus terrificus*, (Sce) *Sistrurus catenatus edwardsi*, (Ca) *Crotalus adamanteus*, (Vs) *Viridovipera stejnegeri*, (Ab) *Agkistrodon bilineatus*; Id, identidade das proteínas utilizadas no alinhamento em relação à Collineina-1.

A tríade catalítica das serinoproteases de peçonha de serpentes, composta pelos resíduos His43, Asp88 e Ser184, assim como os resíduos de aminoácido localizados próximos ao sítio ativo, são altamente conservados nestas toxinas. Os resíduos críticos para a atividade catalítica das serinoproteases podem estar relacionados a uma grande variedade de efeitos fisiopatológicos, como ações sobre a coagulação sanguínea e sistema imunológico (HEDSTROM, 2002a, b). A substituição do resíduo His57 da tríade catalítica de uma toxina homóloga à SVSP de *Trimeresurus jerdonii* por um resíduo de arginina levou à perda da atividade proteolítica desta molécula e, conseqüentemente, de seus efeitos sobre a coagulação sanguínea (WU, 2008).

O resíduo de Asp178 é preservado em todas as serinoproteases analisadas, assim como em outras serinoproteases de peçonha de serpentes, trombinas e calicreínas. Este resíduo está relacionado com a especificidade primária das enzimas semelhantes à tripsina, por interagir com aminoácidos básicos na posição P1 dos possíveis substratos (STUBBS & BODE, 1993). No entanto, os resíduos envolvidos na especificidade primária destas moléculas não são os únicos determinantes na interação com substratos, sendo que a importância de regiões adicionais na ligação de alvos fisiológicos já foi determinada (SERRANO & MAROUN, 2005; KRISHNASWAMY, 2005).

Apesar do alto grau de conservação das estruturas críticas para a atividade e correto enovelamento das serinoproteases de peçonha de serpentes, foram observadas algumas substituições de aminoácidos em regiões secundárias, mesmo entre proteínas de subespécies intimamente relacionadas, como é o caso das enzimas de *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus*. Estes resultados indicam que as SVSPs se encontram em um processo evolutivo, no qual eventos de duplicação gênica, seguida por mutações pontuais ao acaso e rearranjo gênico, resultam no surgimento de isoformas e de variações na especificidade ao substrato.

4.6. Caracterização enzimática e funcional comparativa da Collineína-1 nas formas nativa e recombinante

4.6.1. Atividade fibrinogenolítica

A Collineína-1, nas formas nativa e recombinante, foi avaliada quanto à atividade fibrinogenolítica tanto pela visualização da degradação das cadeias A α , B β e γ do fibrinogênio por SDS-PAGE, quanto pela identificação dos fibrinopeptídeos liberados pela ação da enzima. Quando avaliadas quanto à ação proteolítica sobre as cadeias do fibrinogênio, ambas as enzimas apresentaram comportamento similar, agindo preferencialmente sobre a cadeia A α

(Fig. 23), sendo capazes de clivar completamente essa cadeia com apenas 5 minutos de reação. As proteínas também apresentaram atividade sobre cadeia B β , no entanto essa cadeia só é completamente clivada após 4 horas de incubação com a enzima. Nenhuma das enzimas foi capaz de clivar a cadeia γ do fibrinogênio.

A ação das enzimas foi monitorada pela diminuição da intensidade ou desaparecimento das bandas correspondentes às cadeias do fibrinogênio e o aparecimento de bandas de degradação ausentes no controle. Os principais produtos de degradação resultantes da ação enzimática das serinoproteases sobre o fibrinogênio apresentam massas de aproximadamente 30, 40 e 55 kDa, e aumentam de intensidade com o aumento do tempo de reação. Diversas SVSPs descritas na literatura demonstraram agir sobre as cadeias A α e B β do fibrinogênio de forma tempo-dependente, além de não afetarem a cadeia γ mesmo após longos períodos de incubação (SELISTRE & GIGLIO; 1987; VILCA-QUISPE et al., 2010; VALERIANO-ZAPANA et al., 2012).

Figura 23. Atividade fibrinogenolítica da Collineina-1 nas formas nativa (A) e recombinante (B). Para a avaliação da atividade, 10 μ g das enzimas foram incubadas com uma solução de fibrinogênio bovino (1,5 mg/ml) a 37°C durante diferentes intervalos de tempo. Para o controle negativo, a solução de fibrinogênio foi incubada nas mesmas condições na ausência das enzimas. Após a incubação, as amostras foram visualizadas em SDS-PAGE 13,5%. MM, marcador molecular; Cont-, controle negativo.

O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática hexamérica de aproximadamente 340 kDa, composta por três pares de cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias A α , B β e γ , ligadas entre si por 29 pontes dissulfeto. De forma geral, o fibrinogênio apresenta uma estrutura alongada, composta por três domínios: o domínio central, denominado nódulo E, que contém os resíduos N-terminais das seis cadeias polipeptídicas, e dois domínios distais,

denominados nódulos D, compostos pelas porções C-terminais das cadeias B β e γ . A conversão do fibrinogênio em fibrina é catalisada pela trombina, que promove a clivagem das porções N-terminais das cadeias A α e B β no nódulo E do fibrinogênio, liberando os fibrinopeptídeos A e B, respectivamente. A remoção dos fibrinopeptídeos expõe os sítios de polimerização da região N-terminal das cadeias A α e B β , que interagem com os sítios de polimerização localizados na porção C-terminal dessas mesmas cadeias, resultando na formação de fibras insolúveis, denominadas monômeros de fibrina. A trombina promove também a ativação do fator XIII da coagulação sanguínea, que é uma transglutaminase que catalisa a formação de ligações isopeptídicas entre as cadeias γ da fibrina, levando à formação de dímeros γ - γ , e entre as cadeias α de várias moléculas de fibrina, formando os polímeros α . O coágulo de fibrina estabilizado por ligações cruzadas é forte e resistente à ação do sistema fibrinolítico, sendo eficiente na formação do coágulo sanguíneo (LORD, 2007).

As enzimas trombina-simile de peçonha de serpentes apresentam ação similar à da trombina, sendo capazes de promover a liberação dos fibrinopeptídeos A e/ou B do fibrinogênio. No entanto, a maioria das enzimas trombina-simile difere da trombina por atuarem preferencialmente sobre uma dessas cadeias. A grande maioria das enzimas trombina-simile apresentam especificidade pela ligação peptídica Arg15-Gly16 da cadeia A α do fibrinogênio, e são classificadas como FP-A, como é o caso da crotalase de *C. adamanteus* (MARKLAND et al., 1982), da batroxobina de *Bothrops atrox* (NISHIDA et al., 1994) e da ancrod de *Calloselasma rhodostoma* (NOLAN et al., 1976).

As enzimas trombina-simile que agem preferencialmente sobre a cadeia B β do fibrinogênio, clivando a ligação Arg14-Gly15 destas moléculas, são classificadas como FP-B, e são representadas pela contortrixobina de *Agkistrodon c. contortrix* (AMICONI et al., 2000), stejnefibrase 2 de *Trimeresurus stejneri* (GAO et al., 1998), CdtII-2 de *C. d. terrificus* e CdcII-3 de *C. d. collilineatus* (OLIVEIRA et al., 2009).

Menos comuns são as enzimas FP-AB que, assim como a trombina, agem sobre as cadeias A α e B β do fibrinogênio em proporções semelhantes por clivarem as ligações Arg-Gly inespecificamente, como é o caso da catroxase, de *C. atrox* (SAPRU et al., 1983), da bilineaobina de *Agkistrodon bilineatus* (KOMORI et al., 1993; NIKAI et al., 1995) e da jararacussina de *B. jararacussu* (BORTOLETO et al., 2002). Salvo algumas exceções, a maioria das enzimas trombina-simile já caracterizadas não são capazes de ativar o fator XIII da coagulação sanguínea, fazendo com que o coágulo formado seja suscetível à ação proteolítica da plasmina (CASTRO et al., 2004).

Apesar da avaliação da atividade fibrinogenolítica por SDS-PAGE indicar a especificidade proteolítica das enzimas sobre as cadeias A α e/ou B β , somente a identificação dos produtos de degradação do fibrinogênio por cromatografia de fase reversa é capaz de comprovar que a ação enzimática das serinoproteases resulta na liberação dos fibrinopeptídeos A e B, permitindo a classificação destas enzimas em trombina-simile FB-A, FB-B ou FB-AB. Diante disso, a Collineina-1 na forma nativa e recombinante foi avaliada quanto à liberação dos fibrinopeptídeos após 5, 30, 60 e 120 min de incubação a 37°C com o fibrinogênio (Figs. 24 e 25).

Os fibrinopeptídeos liberados pela ação enzimática das serinoproteases foram identificados por apresentarem o mesmo tempo de retenção na coluna de fase reversa C18, em relação aos fibrinopeptídeos liberados pela ação da trombina. Assim como na avaliação da atividade fibrinogenolítica por SDS-PAGE, as Collineinas-1 nativa e recombinante apresentaram comportamento semelhante, uma vez que ambas as enzimas foram capazes de liberar praticamente todo o fibrinopeptídeo da amostra com apenas 5 min de reação, enquanto que o fibrinopeptídeo B só é completamente liberado após 30 min. Esses resultados permitem classificar a Collineina-1 no grupo das enzimas trombina-simile FP-A, que liberam preferencialmente os fibrinopeptídeos A do fibrinogênio.

Após 120 min de incubação, é possível identificar o aparecimento de um terceiro peptídeo em ambas as enzimas e no controle positivo, denominado peptídeo C. As enzimas TLE-B e TLE-P de *Lachesis muta muta* (MAGALHÃES et al., 2003) e a leucurobina de *B. leucurus* (MAGALHÃES et al., 2007) também demonstraram a capacidade de liberar o peptídeo C após prolongado tempo de incubação com o fibrinogênio. Estudos de espectrometria de massas demonstraram que esse peptídeo corresponde aos 42 resíduos N-terminais da cadeia B β do fibrinogênio humano, e é resultante da clivagem da ligação peptídica Arg42-Ala43 (MAGALHÃES et al., 2003; 2007). No entanto, no caso do fibrinogênio bovino, esse peptídeo pode corresponder aos 49 resíduos N-terminais da cadeia, uma vez que este sítio de clivagem é conservado nas posições Arg49-Ala50 dessa molécula. Evidências indicam que a liberação desse peptídeo da cadeia B β do fibrinogênio pode desempenhar papel importante no processo de polimerização dos monômeros de fibrina (PANDYA et al., 1985).

Figura 24. Perfil de eluição por cromatografia de fase reversa dos fibrinopeptídeos liberados pela ação da Collipase-1 nativa sobre o fibrinogênio. Os fibrinopeptídeos foram gerados pela incubação de 10 μ g de proteínas com fibrinogênio bovino à 37°C por diferentes intervalos de tempo. Após a reação, os peptídeos solúveis foram submetidos à cromatografia de fase reversa em coluna Vydac C18. (A) Controle negativo (fibrinogênio incubado sem a adição de enzima); (B) controle positivo (trombina incubada com fibrinogênio por 120 min); (C) enzima incubada com fibrinogênio por 5 min; (D) enzima incubada com fibrinogênio por 30 min; (E) enzima incubada com fibrinogênio por 60 min; (F) enzima incubada com fibrinogênio por 120 min. * peptídeo correspondente aos 49 resíduos N-terminais da cadeia B β .

Figura 25. Perfil de eluição por cromatografia de fase reversa dos fibrinopeptídeos liberados pela ação da Collineina-1 recombinante sobre o fibrinogênio. Os fibrinopeptídeos foram gerados pela incubação de 10 μ g de proteínas com fibrinogênio bovino à 37°C por diferentes intervalos de tempo. Após a reação, os peptídeos solúveis foram submetidos à cromatografia de fase reversa em coluna Vydac C18. (A) Controle negativo (fibrinogênio incubado sem a adição de enzima); (B) controle positivo (trombina incubada com fibrinogênio por 120 min); (C) enzima incubada com fibrinogênio por 5 min; (D) enzima incubada com fibrinogênio por 30 min; (E) enzima incubada com fibrinogênio por 60 min; (F) enzima incubada com fibrinogênio por 120 min. * peptídeo correspondente aos 49 resíduos N-terminais da cadeia B β .

4.6.2. Atividade coagulante sobre o plasma bovino

A Collineina-1, nas formas nativa e recombinante, foi avaliada quanto à atividade de coagulação do plasma bovino, mostrando uma diminuição do tempo de formação do coágulo diante do aumento da dose das enzimas (Fig. 26). A dose mínima coagulante (DMC) foi definida como a dose capaz de coagular o plasma em 60 segundos. A DMC foi estimada pela regressão logarítmica da curva dose-resposta das enzimas, que foi o tipo de tendência que apresentou maior confiabilidade para os dados obtidos, exibindo valores de R^2 de 0,9029 para a proteína nativa e 0,9101 para a proteína recombinante. Os valores estimados da DMC foram de 0,225 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para a Collineina-1 (Fig. 26A) e 0,08 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para a rCollineina-1 (Fig. 26B), demonstrando um maior potencial coagulante da enzima recombinante em relação à nativa.

Oliveira e colaboradores (2009) determinaram valores de DMC de 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para uma β -fibrinogenase de *C. d. collilineatus*, e 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para uma β -fibrinogenase de *C. d. terrificus*. Já a giroxina isolada de *C. d. terrificus* apresentou DMC variável de 0,015 a 0,037 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em relação ao pH da amostra (BARROS et al., 2011). Embora o presente trabalho tenha demonstrado que a Collineina-1 apresenta DMC próxima aos valores previamente obtidos para serinoproteases de serpentes do gênero *Crotalus*, não é possível fazer uma comparação direta entre esses resultados, uma vez as SVSPs apresentam certo grau de especificidade em relação às espécies na eficiência de conversão do fibrinogênio (LU et al., 2005; CASTRO et al., 2004), e os estudos citados utilizaram plasma humano da determinação das DMCs.

Figura 26. Determinação da dose mínima coagulante da Collineina-1 nativa e recombinante. Para a determinação da dose mínima coagulante (DMC), diferentes doses das enzimas foram incubadas com plasma bovino citratado, e o tempo de formação do coágulo de fibrina foi determinado por sistema fotométrico em coagulômetro Quick Timer II. A DMC foi definida como a quantidade de enzima necessária para coagular o plasma bovino citratado à 37°C em 60 segundos de reação. Resultados expressos pela média $\pm$ SD (n=3). (A) Collineina-1; (B) rCollineina-1.

O mecanismo pelo qual as enzimas trombina-simile induzem a coagulação sanguínea está intimamente relacionado à capacidade dessas enzimas em clivar as cadeias do fibrinogênio, levando à formação de monômeros insolúveis de fibrina (LU et al., 2005; SERRANO & MAROUN, 2005; KINI, 2011). Ambas as enzimas apresentam ação sobre o fibrinogênio similar à da trombina, por liberarem os fibrinopeptídeos A e B, apesar de agirem preferencialmente sobre a cadeia A α . No entanto a Collineina-1 recombinante exibiu atividade coagulante quase três vezes maior do que a proteína nativa. Essa diferença pode estar relacionada às diferenças entre os padrões de enovelamento e modificações pós-traducionais que os organismos nativo e heterólogo realizam na proteína, levando a uma maior eficiência enzimática da Collineina-1 recombinante em relação à forma nativa.

4.6.3. Avaliação sobre substratos cromogênicos

Embora a conversão do fibrinogênio em fibrina seja a atividade mais importante das enzimas trombina-simile, certas SVSPs podem atuar também sobre outros pontos da coagulação sanguínea, como a fibrin(ogen)ólise, a ativação de protrombina e proteína-C, além de apresentarem ações sobre a pressão sanguínea por converterem o cininogênio em cinina (CASTRO et al., 2004; SERRANO & MAROUN, 2005).

Com o objetivo de avaliar a especificidade a diferentes substratos, as enzimas foram incubadas com tripeptídeos sintéticos que mimetizam os sítios de clivagem de substratos naturais específicos para a plasmina (S-2251), fator Xa (S-2222), trombina (S-2238) e calicreína plasmática (S-2302). Os resultados obtidos demonstraram que a especificidade das serinoproteases pelos substratos testados foi similar, embora a atividade da proteína recombinante tenha sido ligeiramente maior do que a da proteína nativa para os substratos S-2238 e S-2302 (Fig. 27).

Assim como a trombina, a Collineina-1, tanto na forma nativa quanto recombinante, apresenta especificidade por substratos que apresentam arginina na posição P1 (S-2222, S-2238 e S-2302), uma vez o substrato S-2251, que apresenta uma lisina nessa posição, não sofreu hidrólise por essas enzimas. Resultados semelhantes foram obtidos para a giroxina de *C. d. terrificus*, que apresentou maior taxa de hidrólise em substratos que apresentam uma arginina na posição P1, seguido por prolina, metionina e lisina (YONAMINE et al., 2012).

Os subsítios S1, S2 e S3, correspondentes aos resíduos D₁₇₈, G₂₀₁ e A₂₀₆ (posições relativas à Collineina-1), respectivamente, são reconhecidos como sítios fundamentais para a

especificidade primária das serinoproteases, e são altamente conservados nas SVSPs e na trombina (CASTRO et al., 2004). Estes subsítios, localizados na superfície da molécula, interagem com o aminoácido presente na posição P1 do substrato, sendo que o resíduo negativamente carregado Asp₁₇₈, localizado no subsítio S1, determina a preferência por um resíduo positivamente carregado nessa posição (SILVA-JUNIOR & DE-SIMONE, 2004).

Além disso, a Collineina-1, nas formas nativa e recombinante, demonstrou uma maior atividade sobre o substrato S-2302, indicando que a fenilalanina presente na posição P2 e a prolina na posição P3 exercem importante influência na hidrólise da ligação Arg-pNA. Braud e colaboradores (2000b) demonstraram a importância dos resíduos 175 e 176 (posições relativas à trombina; localizados nas posições 181 e 182 da Collineina-1) na especificidade pelo sítio P2 do substrato. No entanto, estes resíduos não são conservados entre as serinoproteases de peçonha de serpentes, podendo estar envolvidos nas diferenças de especificidades entre estas enzimas.

Figura 27. Atividade catalítica da Collineina-1 nas formas nativa e recombinante sobre os substratos cromogênicos para trombina (S-2251), fator Xa (S-2222), plasmina (S-2251) e calicreína glandular (S-2301). A hidrólise dos substratos foi determinada pela absorbância a 405 nm após 40 min de reação a 37°C. Os valores de absorbância referentes à incubação do substrato sem a adição das enzimas foram subtraídos dos resultados obtidos. Uma unidade de atividade foi definida como o aumento de 0,01 unidade de absorbância a 405 nm. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=3). (*) $p < 0,05$ em relação à proteína nativa; (**) $p < 0,001$ em relação à proteína nativa (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

A alta atividade das enzimas pelos substratos para fator Xa (S-2222) e calicreína glandular (S-2302) sugere que a Collineina-1 pode apresentar efeitos de ativação de protrombina e liberação de cinina *in vivo*. A Crotalase purificada da peçonha de *C. adamanteus* apresentou maior eficiência catalítica sobre o substrato sintético para a calicreína, além de demonstrar experimentalmente a ação de conversão do cininogênio em cinina (MARKLAND et al., 1982). Resultados semelhantes foram apresentados por Komori e colaboradores (1988), que isolaram uma serinoprotease da peçonha de *C. viridis viridis* que, além de agir sobre substrato sintético e natural para calicreína, induz também hipotensão *in vivo*. No entanto, é válido ressaltar que os dados obtidos no presente trabalho podem não refletir as reais ações da serinoprotease sobre a circulação sanguínea, sendo necessária a avaliação experimental da atividade dessas enzimas sobre os substratos naturais.

A ação catalítica em resposta ao aumento da concentração das formas nativa e recombinante da Collineina-1 foi avaliada utilizando o substrato S-2302, uma vez que este apresentou a maior suscetibilidade a essas enzimas. Tanto a Collineina-1 nativa quanto a recombinante apresentaram uma resposta dose-dependente em relação ao substrato utilizado, sendo que a ação catalítica das enzimas foi significativamente reduzida pela ação do inibidor específico para serinoproteases PMSF (Figs. 28 e 29). Este inibidor age diretamente no sítio catalítico das serinoproteases, modificando a serina ativa de forma irreversível (JIANG et al., 2011). Contudo, a Collineina-1 recombinante é aparentemente mais suscetível à inibição por PMSF, sugerindo que a estrutura tridimensional dessa molécula pode apresentar diferenças em relação à forma nativa, resultando em uma maior acessibilidade ao sítio ativo. Além disso, essa acessibilidade pode ser alterada também pelas diferenças nos padrões de glicosilação presentes na Collineina-1 na forma nativa e recombinante, já que evidências indicam que os motivos carboidrato presentes nessas glicoproteínas podem restringir a entrada da cavidade do sítio catalítico, quando localizados espacialmente próximos a essa região da molécula (ZHU et al., 2005; MACKESSY, 2010). Por outro lado, o inibidor específico para metaloprotease 1,10 fenantrolina não influenciou a atividade das enzimas (Fig. 29), indicando que a ação da Collineina-1 sobre o substrato não está sofrendo a interferência de contaminantes.

Figura 28. Efeito da concentração da Collineina-1 nativa (A) e recombinante (B) sobre a hidrólise do substrato cromogênico S-2302. A hidrólise dos substratos foi determinada pela absorbância a 405 nm após 10, 20 e 40 min de reação a 37°C. Os valores de absorbância referentes à incubação do substrato sem a adição das enzimas foram subtraídos dos resultados obtidos. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

Figura 29. Efeito de inibidores sobre a atividade da Collineina-1 nas formas nativa e recombinante sobre o substrato S-2302. As enzimas foram pré-incubadas por 30 min a 37°C com os inibidores PMSF e 1,10-fenantrolina (20 mM). Após a incubação, a reação foi iniciada pela adição do substrato S-2302, e a absorbância foi monitorada a 405 nm por 40 min. Os resultados foram expressos pela média $\pm$ SD (n=3). (***) $p < 0,0001$ em relação à proteína nativa (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

4.6.4. Estabilidade a diferentes condições de temperatura e influência de íons divalentes na atividade esterásica sobre o TAME

A influência da pré-incubação da Collineina-1 nativa e recombinante na presença de íons divalentes e em diferentes condições de temperatura foi avaliada pelo monitoramento da atividade esterásica das enzimas sobre o substrato TAME. As análises da atividade esterásica das serinoproteases diante de variações nas condições de temperatura demonstraram que essas enzimas são altamente termoestáveis, uma vez que a atividade da Collineina-1 nativa e recombinante não foi afetada mesmo após incubação à temperatura extrema de 100°C (Fig. 30). Apesar de não haver dados na literatura relacionados à termoestabilidade de serinoproteases de peçonhas crotálicas, Yonamine e colaboradores (2012) determinaram o aumento da atividade enzimática da gioxina de *C. d. terrificus* com o acréscimo da temperatura até 45°C.

Figura 30. Estabilidade da Collineina-1 nas formas nativa e recombinante em diferentes condições de temperatura. A estabilidade das enzimas foi avaliada em relação à atividade esterásica sobre o substrato TAME. As proteínas foram pré-incubadas por 30 min a diferentes temperaturas, e a atividade foi monitorada pela absorbância a 247 nm após 30 min de reação. Uma unidade de atividade esterásica (U) foi definida como o aumento de 0,01 unidade de absorbância a 247 nm. Os resultados foram apresentados em U/mg de proteína e expressos pela média $\pm$ SD (n=3).

Vários trabalhos descrevem a avaliação da estabilidade de uma diversidade de SVSPs diante de variações de temperatura utilizando diferentes ensaios, como atividades de coagulação do plasma, fibrinogenólise e hidrólise de substratos sintéticos (MARKLAND &

DAMUS, 1971; LIU et al., 2008; TANG et al., 2009; COSTA et al., 2009; BARROS et al., 2011; VALERIANO-ZAPANA et al., 2012; YONAMINE et al., 2012). Independente do método utilizado, esses estudos demonstraram que as serinoproteases de peçonha de serpentes são enzimas resistentes à desnaturação pela ação da temperatura, sendo que a perda completa da atividade devido ao calor é dificilmente observada. Por outro lado, em nenhum desses trabalhos foi demonstrada a conservação total da atividade enzimática após a pré-incubação das enzimas à 100°C. A elevada resistência da Collineina-1 na forma nativa e recombinante diante de condições extremas de temperatura desperta o interesse para possíveis aplicações biotecnológicas dessa molécula. Além disso, uma análise mais aprofundada das características estruturais e funcionais dessas enzimas poderá levar à elucidação dos fatores que influenciam a estabilidade dessa classe de proteínas.

A resistência das SVSPs frente a variações nas condições de temperatura é provavelmente decorrente do fato da estrutura tridimensional dessas moléculas ser estabilizada por seis pontes dissulfeto, aumentando o limiar de energia necessária para romper essas ligações e gerar mudanças expressivas na conformação dessas enzimas. Além da resistência devido à presença das pontes dissulfeto, o motivo carboidrato ligado às SVSPs pode também conferir estabilidade a essas enzimas, mesmo após a exposição das mesmas a condições extremas (MACKESSY, 2010). Silva-Junior e colaboradores (2007) demonstraram que a termoestabilidade da enzima BJ-48, isolada da peçonha de *B. jararacussu*, foi perdida após a deglicosilação dessa serinoprotease. Da mesma forma, a protease A, isolada da peçonha de *B. jararaca* (PAES-LEME et al., 2008) e a brevinase, de *A. blomhoffii brevicaudus* (LEE et al., 1999) se mostraram mais resistentes ao calor quando comparadas com as enzimas deglicosiladas.

Os ensaios realizados para avaliar a influência de íons divalentes na atividade esterásica das serinoproteases demonstraram a diminuição significativa da atividade das mesmas pelo íon Zn^{2+} e a inibição quase que completa das enzimas na presença de Cu^{2+} (Fig. 31). A presença de Ba^{2+} resultou na diminuição da atividade da Collineina-1 nativa, enquanto a enzima recombinante se mostrou resistente à ação desse íon metálico. Por outro lado, os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} não influenciaram de forma significativa a atividade esterásica de nenhuma das enzimas.

As serinoproteases de peçonha de serpentes são proteínas que independem de qualquer íon para o desempenho de suas funções enzimáticas. Assim como a tripsina, as enzimas trombina-simile perderam a capacidade de reconhecimento de cátions monovalentes, como

Na^+ , devido a uma substituição de um resíduo de tirosina (presente na trombina) por uma prolina na posição 225, deixando assim de sofrer regulação alostérica por este tipo de íon. No entanto, diversos autores demonstraram que alguns íons divalentes podem influenciar a atividade catalítica de diversas SVSPs, provavelmente por promoverem pequenas alterações na conformação tridimensional dessas moléculas, que dependem das características físico-químicas específicas de cada proteína.

Há apenas um trabalho na literatura que descreve a influência de íons metálicos sobre a atividade enzimática de serinoproteases isolada da peçonha de serpentes do gênero *Crotalus*. Assim como observado no presente trabalho, Barros e colaboradores (2011) determinaram a perda total da atividade da giroxina de *C. d. terrificus* sobre o substrato cromogênico S-2238 na presença de Cu^{2+} e diminuição significativa dessa atividade na presença de Ba^{2+} , embora a giroxina tenha sofrido também a influência do íon Mn^{2+} , que não foi testado para a Collineína-1.

Figura 31. Interferência de diferentes íons divalentes na atividade esterásica da Collineína-1 nativa e recombinante sobre o TAME. As proteínas foram pré-incubadas por 30 min com tampões contendo os íons divalentes, e a atividade foi monitorada pela absorbância a 247 nm após 30 min de reação a 37°C. Uma unidade de atividade esterásica (U) foi definida como o aumento de 0,01 unidade de absorbância a 247 nm. Os resultados foram apresentados em U/mg de proteína e expressos pela média $\pm$ SD (n=3). (*) $p < 0,05$ em relação aos respectivos controles positivos de atividade (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

4.6.5. Ensaios de cinética enzimática

A determinação dos parâmetros cinéticos da Collineina-1 na forma nativa e recombinante foi realizada pela avaliação da atividade esterásica das enzimas sobre o substrato TAME. O TAME é um substrato sintético que apresenta uma ligação éster com o aminoácido arginina, sendo comumente empregado como substrato para serinoproteases, como tripsina, trombina e plasmina. A atividade esterásica da tripsina sobre o TAME é baseada em uma etapa rápida de acilação, com a formação de acil-enzima, seguida de uma lenta deacilação, que resulta na formação do produto final (FASTREZ & FERSHT, 1973). As SVSPs apresentam um alto grau de conservação do domínio ativo quando comparadas com a quimotripsina, tripsina, trombina e calicreína, sendo que essas enzimas compartilham o mesmo mecanismo catalítico, baseado em uma reação de acilação e desacilação, na qual a Ser195 tem ação nucleofílica e o resíduo de His57 atua como doador/aceptor de prótons (POLGÁR, 1971).

A atividade enzimática de ambas as serinoproteases seguiram o modelo cinético de Michaelis-Menten, exibindo uma curva hiperbólica de velocidade *versus* concentração (Fig. 32). Os valores de K_m e V_{max} para o substrato TAME foram determinados pela derivação da curva elíptica de Michaelis-Menten pelo programa gráfico *GraphPad Prism*, versão 5.0. A velocidade máxima (V_{max}) representa a velocidade da reação atingida na concentração de saturação do substrato, e a constante de Michaelis-Menten (K_m) é a concentração de substrato na qual a velocidade de reação é a metade da V_{max} (LEHNINGER et al., 2005). Os valores de *turnover* (K_{cat}) e da eficiência catalítica (K_{cat}/K_m) das formas nativa e recombinante da Collineina-1 foram calculados a partir dos valores de K_m e V_{max} . Os parâmetros cinéticos obtidos para as serinoproteases são apresentados na tabela 5.

Figura 32. Curva cinética de Michaelis-Menten da Collineina-1 nativa (A) e recombinante (B) para o substrato TAME. Os ensaios foram realizados pela incubação de 5 μg de proteínas com diferentes concentrações de TAME (0.125 a 2 mM) em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,5 contendo 0,05M de CaCl_2 , em um volume final de 1 mL. A atividade foi monitorada por absorbância a 247 nm após 30 min de reação a 37°C. A velocidade da reação (V_0) foi expressa em mM de produto formado por minuto, considerando o coeficiente de extinção molar de $540 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o produto.

TABELA 5 - Parâmetros cinéticos da Collineina-1 na forma nativa e recombinante para o substrato TAME

Enzimas	Parâmetros Enzimáticos			
	V_{max} (mM.min ⁻¹)	K_m (mM)	K_{cat} (min ⁻¹)*	K_{cat}/K_m (mM.min ⁻¹)**
Collineina-1	0,06	1,430	358,5	250,69
rCollineina-1	0,07	1,682	417,2	248,03

* K_{cat} corresponde à $V_{max}/[E]$, sendo $[E]$ a concentração molar da enzima no volume final do ensaio; K_{cat} ou número de *turnover* é o número de vezes que cada sítio catalítico converte o substrato em produto por unidade de tempo;

** K_{cat}/K_m corresponde à eficiência catalítica, ou seja, o número de moléculas de substrato convertidas em produto por sítio catalítico por unidade de tempo.

A Collineina-1 nativa apresentou um valor maior de K_m em relação à proteína recombinante, o que evidencia uma maior afinidade pelo substrato TAME. No entanto, a eficiência catalítica das enzimas, expressa pela relação K_{cat}/K_m , demonstrou que as serinoproteases não diferem significativamente na eficiência em hidrolisar o substrato.

Devido à capacidade das SVSPs de agir sobre uma variedade de substratos, os trabalhos presentes na literatura divergem amplamente no tipo de ensaio utilizado para a

determinação dos parâmetros cinéticos dessas enzimas. O TAME é um dos substratos mais utilizados para a avaliação da cinética enzimática de SVSPs, o que possibilita a comparação dos dados obtidos no presente trabalho com os previamente descritos.

Iwasaki e colaboradores (1990) determinaram uma relação K_{cat}/K_m de $123,4 \times 10^{-5} \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$ para a enzima okinaxobina-I de *Trimeresurus okinavensis*. Por outro lado, alguns autores determinaram valores substancialmente maiores para outras SVSPs em relação a esse parâmetro cinético, como Aguiar e colaboradores (1996), que obtiveram um valor de $232 \times 10^6 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$ para a proteinase LMR-47 de *Lachesis muta rhombeata* e Siigur e colaboradores (1991) que determinaram uma eficiência catalítica na grandeza de 6633 $\text{mM} \cdot \text{min}^{-1}$ para uma β -fibrinogenase de *Vipera lebetina*. Já Nikandrov e colaboradores (2005) relataram que a enzima actibina, isolada da peçonha de *Deinagkistrodon actus*, apresentou uma relação K_{cat}/K_m de 2937 $\text{mM} \cdot \text{min}^{-1}$ contra 6,10 $\text{mM} \cdot \text{min}^{-1}$ para a trombina. Os ensaios cinéticos realizados no presente estudo demonstram que a Collineina-1 exibe, de forma geral, uma eficiência catalítica inferior à das outras SVSPs estudadas, embora essa enzima apresente maior eficiência em clivar o substrato TAME em relação à trombina.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os mecanismos pelos quais as enzimas Trombina-simile de peçonhas de serpentes afetam a coagulação sanguínea não foram, até o momento, completamente esclarecidos. Assim, pesquisas que apresentem como objetivo elucidar os aspectos relacionados à estrutura, função e mecanismos de ação destas moléculas podem contribuir na descoberta de novos alvos para o tratamento de disfunções fisiológicas relacionadas à coagulação sanguínea. No entanto, para possibilitar essas pesquisas, é necessário o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para a produção de proteínas em escala laboratorial. Não menos importante, é o desenvolvimento de técnicas de produção de moléculas em escala industrial, que viabilizem assim a disponibilização de novos agentes terapêuticos para a indústria farmacêutica.

O presente trabalho descreve um método de produção heteróloga de uma serinoprotease clonada da glândula de peçonha de *C. d. collilineatus* em sistema *P. pastoris*, que resultou em um alto rendimento em termos de quantidade e funcionalidade da proteína recombinante. Além disso, esse estudo tem como diferencial a obtenção da serinoprotease a partir da peçonha e a comparação das propriedades enzimáticas entre a forma nativa e recombinante da proteína, como uma forma de validação do processo de produção.

As similaridades entre as propriedades enzimáticas observadas para a Collineina-1 nas formas nativa e recombinante podem refletir a conservação de características estruturais importantes para a atividade catalítica dessas moléculas. A expressão de proteínas em *P. pastoris* normalmente resulta na obtenção de moléculas recombinantes corretamente enoveladas e processadas, uma vez que as leveduras são organismos eucariotos que apresentam a mesma estrutura intracelular e a capacidade de realizar muitas das modificações pós-traducionais de organismos superiores. Diante disso, trabalhos que comparam a atividade de proteínas expressas em leveduras com as proteínas obtidas de fontes naturais têm demonstrado pouca ou nenhuma divergência nas propriedades estruturas e funcionais entre as formas nativa e recombinante dessas moléculas (SCHILLING et al., 2002; YOU et al., 2004; GUIRAUDIE-CAPRAZ et al., 2005; SHUKLA et al., 2007). Por outro lado, há na literatura somente um trabalho que compara as características funcionais de uma SVSPs expressa em *P. pastoris* com sua forma nativa (YOU et al., 2004). No entanto, apesar da escassez de dados de validação da expressão heteróloga de SVSPs em levedura, este sistema eucarioto tem se mostrado eficiente na produção dessa classe de proteínas.

A metodologia empregada na purificação da serinoprotease nativa resultou no isolamento de duas isoforma, denominadas Collineina-1 e 2, que apresentam massas molares

de 29.475 e 29.388 Da, respectivamente, e diferem entre si em relação à estrutura primária pela substituição de cinco resíduos de aminoácidos. Futuramente, essas serinoproteases serão caracterizadas quanto às propriedades enzimáticas e funcionais de forma a correlacionar essas substituições com o mecanismo de ação dessas moléculas. Já a Collineina-1 recombinante difere de sua forma nativa em relação à massa molar, que foi determinada em 28.868 Da, indicando que essa proteína pode estar sujeita à ação proteolítica durante o processo de expressão em sistema heterólogo. Além disso, é possível que a proteína na forma recombinante apresente um padrão de glicosilação diferente da forma nativa. Essas diferenças quanto ao conteúdo de carboidrato podem explicar a maior suscetibilidade da rCollineina-1 ao inibidor PMSF e a maior capacidade dessa enzima em coagular o plasma, já que em alguns casos, os oligossacarídeos delimitam a entrada da cavidade catalítica e exercem influência na acessibilidade do sítio ativo (ZHU et al., 2005; MACKESSY, 2010).

Talvez o resultado mais surpreendente desse trabalho tenha sido a determinação da alta resistência da enzima na forma nativa e recombinante diante de condições extremas de temperatura. Até o momento, nenhuma serinoprotease de peçonha de serpente foi capaz de conservar integralmente a atividade enzimática após ser submetida à temperatura de 100°C. A elevada termoestabilidade, aliada às propriedades funcionais dessas enzimas, lança luz à perspectiva da aplicação das mesmas como possíveis agentes biotecnológicos ou como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de uma diversidade de distúrbios de caráter hemostático.

Por outro lado, nos aspectos da pesquisa básica, o sucesso na padronização de um método de produção heteróloga da serinoprotease farmacologicamente ativa é importante, não somente para permitir o aprofundamento da caracterização funcional e biológica das mesmas, mas também para possibilitar futuras manipulações moleculares, visando à descoberta dos mecanismos envolvidos no reconhecimento de substratos.

5.1. Outras considerações

Os experimentos de clonagem, sequenciamento de nucleotídeos e expressão heteróloga de proteínas foram realizados em colaboração com Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar. As análises por espectrometria de massas foram desenvolvidas no Laboratório de Espectrometria de Massas do Departamento de Química da Universidade de Liège - ULg, Bélgica, sob supervisão dos Professores Dr. Loïc Quinton e Dr. Edwin de Pauw, durante

estágio realizado no período de 16 de agosto a 14 de setembro de 2012. Parte dos ensaios de caracterização funcional e enzimática foi realizada em colaboração com as professoras Dr^a. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila e Dr^a. Renata Santos Rodrigues do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia - UFU.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A. S.; ALVES, C. R.; MELGAREJO, A.; DE-SIMONE, G. S. Purification and partial characterization of a thrombin-like/gyroxin enzyme from bushmaster (*Lachesis muta rhombeata*) venom. **Toxicon** v. 34, p. 555-565, 1996.

ALEXANDER, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHWARTZMAN, R. J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a trombina-simile enzyme. **Toxicon** v.26, p. 953-960, 1988.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res** v. 25, p. 3389-3402, 1997.

AMICONI, G.; AMORESANO, A.; BOUMIS, G.; BRANCACCIO, A.; DE CRISTOFARO, R.; DE PASCALIS, A.; DI GIROLAMO, S.; MARAS, B.; SCALONI, A. A novel venombin B from *Agkistrodon contortrix contortrix*: evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from thrombin. **Biochemistry** v. 39, p. 10294-10308, 2000.

AMORA, D. N.; SOUZA, T. S.; MARTINS, A. M. C.; BARBOSA, P. S. F.; MAGALHÃES, M. R.; TOYAMA, M. H.; FONTELES, M. F.; MENEZES, D. B.; MONTEIRO, H. S. A. Effects of *Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon** v. 47, p. 260-264, 2006.

APWEILER, R.; HERMJAKOB, H.; SHARON, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. **BBA-Gen Subjects** v. 1473, p. 4-8, 1999.

ASSAKURA, M. T.; FURTADO, M. D.; MANDELBAUM, F. R. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Comp Biochem Physiol** v. 102, p. 727-732, 1992.

BAKKEN, G. S.; KROCHMAL, A. R. The imaging properties and sensitivity of the facial pit of pitvipers as determined by optical and heat-transfer analysis. **J Exp Biol** v. 210, p. 2801-2810, 2007.

BARR, K. A.; HOPKINS, S. A.; SREEKRISHNA, K. Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. **Pharm Eng** v. 12, p. 48-51, 1992.

BARRIO, A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom, **Acta Physiol Latinoamer** v. 11, p. 224, 1961.

BARROS, L. C.; FERREIRA, R. S. JR; BARRAVIERA, S. R.; STOLF, H. O.; THOMAZINI-SANTOS, I. A.; MENDES-GIANNINI, M. J.; TOSCANO E.; BARRAVIERA, B. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. **J Toxicol Environ Health, Part B** v. 12, p. 553-71, 2009.

BARROS, L. C.; SOARES, A. M.; COSTA, F. L.; RODRIGUES, V. M.; FULY, A. L.; GIGLIO, J. R.; GALLACCI, M.; THOMAZINI-SANTOS, I. A.; BARRAVIERA, S. R. C. S.; BARRAVIERA, B.; FERREIRA-JUNIOR, R. S. Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **J Venom Anim Toxins** v. 17, p. 23-3, 2011.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res** v. 7, n. 6, p. 1513-23, 1979.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Caderno de Saúde Pública** v. 19, p.7-16, 2003.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; RODRIGUES, R. S.; FONSECA, F. P.; MENALDO, D. L.; FERREIRA, F. B.; HENRIQUE-SILVA, F.; SOARES, A. M.; HAMAGUCHI, A.; RODRIGUES, V. M.; OTAVIANO, A. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: analysis of gene expression profile. **Biochimie** v. 91, p. 586-595, 2009.

BOLDRINI-FRANCA, J.; CORREA-NETTO, C.; SILVA, M. M. S.; RODRIGUES, R. S.; DE LA TORRE, P.; PEREZ, A.; SOARES, A. M.; ZINGALI, R. B.; NOGUEIRA, R. A.; RODRIGUES, V. M.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **Journal of Proteomics** v. 73, n. 9, p. 1758-1776, 2010.

BON, C.; BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M. S.; LAMBEZAT, M. P.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Act Physiol Pharmacol Latinoam** v. 39, p. 39-448, 1989.

BORTOLETO, R. K.; MURAKAMI, M. T.; WATANABE, L.; SOARES, A. M.; ARNI, R. K. Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon** v. 40, p. 1307-1312, 2002.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** v. 72, p. 248-254, 1976.

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

BRAUD, S.; PARRY, M. A. A.; MAROUN, R.; BON, C.; WISNER, A. The contribution of residues 192 and 193 to the specificity of snake venom serine proteinases. **J Biol Chem** v. 275, p. 1823-1828, 2000b.

BRIERLEY, R. A.; DAVIS, R. G.; HOLTZ, C. G. **Production of insulin-like growth factor-I in methylotrophic yeast cells**. US 5.324.639. 19 set. 1994.

BULLOCK, T. H.; COWLES, R. B. Physiology of an infrared receptor: the facial pit of pit vipers. **Science** v. 115, p. 541-543, 1952.

CALERA, J. A.; PARIS, S.; MONOD, M.; HAMILTON, A. J.; DEBEAUPUIS, J. P.; DIAQUIN, M.; LOPEZ-MEDRANO, R.; LEAL, F.; LATGE, J. P. Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. **Infect Immun** v. 65, p. 4718-4724, 1997.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters** v. 583, p. 1736-1743, 2009.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; CID, P.; DE LA TORRE, P.; FLORES-DÍAZ, M.; DOS SANTOS, M.C.; BORGES, A.; BREMO, A.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; ALAPE-GIRÓN, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Snake venomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. **J Proteome Res** v. 9, p. 528-544, 2010.

CAMILLO, M. A. P.; PAES, P. C. A.; TRONCONE, L. R. P.; ROGERO, J. R. Gyroxin fails to modify in vitro release of labeled dopamine and acetylcholine from rat and mouse striatal tissue. **Toxicon** v. 39, p. 843-853, 2001.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of Latin America**. Cornell University Press: Ithaca, NY. 1989.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Comstock Publishing Associates: Ithaca, NY, 2004.

CARDOSO, J. L. C. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes**. Sarvier: São Paulo, 2003.

CASEWELL, N. R.; WÜSTER, W.; VONK, F. J.; HARRISON, R. A; FRY, B. G. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. **Trends Ecol Evol** v. 28, p. 219-229, 2013.

CASTRO H. C.; ZINGALI R. B.; ALBUQUERQUE M. G.; PUJOL-LUZ M.; RODRIGUES C. R. Snake venom trombina-simile enzymes: from reptilase to now. **Cell Mol Life Sci** v.61, p.843–856, 2004.

CHANG, C. C. & SU, M. J. A study on the interaction of crotapotina with crotoxina phospholipase A₂ notexin and other presynaptic neurotoxins. **Br J Pharmac** v. 73, p. 495-503. 1981.

CHEN, T.; RAEL, E. D. Purification of M5, a fibrinolytic proteinase from *Crotalus molossus molossus* venom that attacks complement. **Int J Bioc Cell Biol** v. 29, p. 789-99, 1997.

CHIOU, S. H.; HUNG, C. C.; HUANG, K. F. Characterization of a protease with alpha-fibrinogenase and beta-fibrinogenase activity from the western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*. **Biochem Bioph Res Co** v. 187, p. 389-396, 1992.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon** v. 29, p. 1279-1303, 1991.

CHOUMET, V.; SALIOU, B.; FEDERLER, L.; CHEN, Y. C.; GUBENSEK, F.; BO, C. DELOT, E. Snake venom phospholipase A₂ neurotoxins. **Eur J Biochem** v. 211, p. 57-62, 1993.

CLARE, J. J.; ROMANOS, M. A.; RAYMENT, F. B.; ROWEDDER, J. E.; SMITH, M. A.; PAYNE, M. M.; SREEKRISHNA, K.; AND HENWOOD, C. A. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. **Gene** v. 105, p. 205–212, 1991.

COHN, M. I.; COHN, M. Barrel rotation induced by somatostatin in the non-lesioned rat. **Brain Res** v. 96, p. 139-141, 1975.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucl Acids Res** v. 16, p. 10881-10890, 1988.

COSTA, F. L. S. RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; MENALDO, D. L.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FULY, A. L.; SOARES, S. G.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; BARRAVIERA, B.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon** v. 54, p. 725-735, 2009.

CREGG, J. M.; BARRINGER, K. J.; HESSLER, A. Y.; MADDEN, K. R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Mol Cell Biol** v. 5, p. 3376-3385, 1985.

CREGG, J. M.; MADDEN, K. R. Development of yeast transformation systems and construction of methanol-utilization-defective mutants of *Pichia pastoris* by gene disruption. In **Biological Research on Industrial Yeasts** (STEWART, G. G.; RUSSELL, I.; KLEIN, R. D.; HIEBSCH, R. R. Eds.), CRC Press: Boca Raton, pp. 1-18, 1987.

CREGG, J. M.; TSCHOPP, J. F.; STILLMAN, C.; SIEGEL, R.; AKONG, M.; CRAIG, W. S.; BUCKHOLZ, R. G.; MADDEN, K. R.; KELLARIS, P. A.; DAVIS, G. R.; SMILEY, B. L.; CRUZE, J.; TORREGROSSA, R.; VELICELEBI, G.; THILL, G. P. High-level expression and efficient assembly of hepatitis-B surface-antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Bio-Technology** v. 5, p. 479-485, 1987.

CREGG, J. M.; LIN-CEREGRINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. **Mol. Biotechnology** v.16, p.23-52, 2000.

CREGG, J.M. **Method Mol Cell Biol: Pichia Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2007.

DA SILVA, J. A. A. U.; MURAMOTO, E.; RIBELA, M. T. C. P.; ROGERO, J. R.; CAMILLO, M. A. P. Biodistribution of gyroxin using I-125 as radiotracer. **J Radioanal Nucl Ch** v. 269, p. 579-583, 2006.

DA SILVA, J. A. A.; SPENCER, P.; CAMILLO, M. A.; DE LIMA, V. M. F. Gyroxin and Its Biological Activity: Effects on CNS Basement Membranes and Endothelium and Protease-Activated Receptors. **Curr Med Chem** v. 19, p. 281-291, 2012.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science** v. 145, p. 1310, 1964.

DEKHIL, H.; WISNER, A.; MARRAKCHI, N.; EL AYEB, M.; BON, C.; KAROUI, H. Molecular cloning and expression of a functional snake venom serine proteinase, with platelet aggregating activity, from the *Cerastes cerastes* viper. **Biochemistry** v. 42, p. 10609-10618, 2003.

DESHIMARU, M.; OGAWA, T.; NAKASHIMA, K.; NOBUHISA, I.; CHIIWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y. et al. Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. **FEBS Lett** v. 397, p.83–88, 1996.

DOLEY, R.; MACKESSY, S. P.; KINI, R. M. Role of accelerated segment switch in exons to alter targeting (ASSET) in the molecular evolution of snake venom proteins. **BMC Evol Biol** v.30, p.146, 2009.

EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **Eur J Biochem** v. 1, p. 80-91, 1967.

ESPINO-SOLIS, G. P.; RIAÑO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Antidotes against venomous animals: state of the art and prospectives. **J Proteomics** v. 72, p. 183-199, 2009.

EVANGELISTA, J. S.; MARTINS, A. M.; NASCIMENTO, N. R.; SOUSA, C. M.; ALVES, R. S.; TOYAMA, D. O.; TOYAMA, M. H.; EVANGELISTA, J. J.; MENEZES, D. B.; FONTELES, M. C.; MORAES, M. E.; MONTEIRO, H. S. Renal and vascular effects of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon** v. 52, p. 737-44, 2008.

FAN, C. Y.; QIAN, Y. C.; YANG, S. L.; GONG, Y. Cloning, sequence analysis and expression in *E. coli* of the cDNA of the trombina-simile enzyme (pallabin) from the venom of *Agkistrodon halys pallas*. **Biochem Mol Biol Int** v. 47, p.217-25, 1999.

FASTREZ, J.; FERSHT, A. R. Demonstration of acyl-enzyme mechanism for hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin. **Biochemistry** v. 12, p. 2025-2034, 1973.

FONSECA, F. V.; ANTUNES, E.; MORGANTI, R. P.; MONTEIRO, H. S. A.; MARTINS, A. M. C.; TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H. Characterization of a new platelet aggregating factor from crotoxin *Crotalus durissus cascavella* venom. **Protein Journal** v. 25, p. 183-192, 2006.

FRANCISCHETTI, I. M.; SALIOU, B.; LEDUC, M.; CARLINI, C. R.; HATMI, M.; RANDON, J.; FAILI, A.; BON, C. Convulxin, a potent platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom, specifically binds to platelets. **Toxicon** v. 35, p. 1217-28, 1997.

FRY, B. G.; WÜSTER, W.; RAMJAN, S. F. R.; JACKSON, T.; MARTELLI, P.; KINI, R. M. Analysis of Colubroidea snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: evolutionary and toxicological implications. **Rapid Commun Mass Spectrom** v. 17, p. 2047-2062, 2003.

FRY, B. G. From genome to “venome”: Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. **Genome Res** v. 15, p. 403-420, 2005.

FRY, B. G.; SCHEIB, H.; VAN DER WEERD, L.; YOUNG, B.; MCNAUGHTAN, J.; RAMJAN, S. F.; VIDAL, N.; POELMANN, R. E.; NORMAN, J. A. Evolution of an Arsenal: Structural and Functional Diversification of the Venom System in the Advanced Snakes (Caenophidia). **Mol Cell Proteomics** v. 7, p. 215-46, 2008.

FRY, B.; VIDAL, N.; VAN DER WEERD, L.; KOCHVA, E.; RENJIFO, C. Evolution and diversification of the Toxicofera reptile venom system. **J Proteomics** v. 72, p. 127-136, 2009.

FULY, A.L.; MACHADO, O.L.; ALVES, E.W.; CARLINI, C.R. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A2 isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Thromb Haem** v. 78, p. 1372-1380, 1997.

GAO, R.; ZHANG, Y.; MENG, Q. X.; LEE, W. H.; LI, D. S.; XIONG, Y. L.; WANG, W. Y. Characterization of three fibrinogenolytic enzymes from Chinese green tree viper (*Trimeresurus stejnegeri*) venom. **Toxicon** v. 36, p. 457-467, 1998.

GLOYD, H. K. **The Rattlesnakes, Genera *Sistrurus* and *Crotalus*: A Study in Zoogeography and Evolution**. Chicago Academy of Sciences: Chicago, 1940.

GOMES, C. L.; KONNO, K.; CONCEIÇÃO, I. M.; IANZER, D.; YAMANOUYE, N.; PREZOTO, B. C.; ASSAKURA, M. T.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; YAMANE, T.; SANTOS, R. A.; DE CAMARGO, A. C.; HAYASHI, M. A. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland of a rattlesnake allowed the evaluation of the structure-function relationship of BPPs. **Biochem Pharmacol** v. 74, p. 1350-60, 2007.

GREENE, H. **Snakes: The Evolution of Mystery in Nature**. Univ. of California Press: Berkeley, 1997.

GUIRAUDIE-CAPRAZ, G.; CLOT-FAYBESSE, O.; PAGEAT, P.; MALOSSE, C.; CAIN, A. H.; RONIN, C.; NAGNAN-LE M. P. Heterologous expression of piglet odorant-binding protein in *Pichia pastoris*: a comparative structural and functional characterization with native forms. **J Biotechnol** v. 117, p. 11-19, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M.; DOS SANTOS, M. C.; FURTADO, M. F.; ROJAS G. Biochemical and pharmacological similarities between the venoms of newborn *Crotalus durissus durissus* and adult *Crotalus durissus terrificus* rattlesnakes. **Toxicon** v. 29, p. 1273-1277, 1991.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venoms. **Mem Inst Butantan** v.33, p. 1405-1474, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; ALAPE-GIRÓN, A.; FLORES-DÍAZ, M.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; CALVETE, J. J. Snake venomomics and antivenomics: proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. **J Proteomics** v. 72, p. 165-182, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M.; WILLIAMS, D.; FAN, H. W.; WARRELL, D. A. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon** v. 56, p. 1223-1235, 2010.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G.; BURNOUF, T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. **Biologicals** v. 39, p.129-142, 2011.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl Acids Symp Ser** v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMAKO, J.; SUZUKI, Y.; HAYASHI, N.; KIMURA, M.; OZEKI, Y.; HASHIMOTO, K.; MATSUI, T. Amino acid sequence and characterization of C-type lectin purified from the snake venom of *Crotalus ruber*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol** v. 146, p. 299-306, 2007.

HEDSTROM, L., An overview of serine proteases. **Curr Protoc Protein Sci Chapter** v. 21. p. 2.10.1-2.10.8, 2002a.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chem Rev** v. 102, p. 4501-4524, 2002b.

HERMOGENES, A. L.; RICHARDSON, M.; MAGALHAES, A.; YARLEQUE, A.; RODRIGUEZ, E.; SANCHEZ, E. F. Interaction of a plasminogen activator proteinase, LV-PA with human alpha 2-macroglobulin. **Toxicon** v. 47, p. 490-494, 2006.

HIGGINS, D. R.; CREGG, J. M. *Pichia* Protocols, **Method in Molecular Cell Biology** Totowa-NJ: Humana Press, 1998.

HIGUCHI, S.; MURAYAMA, N.; SAGUCHI, K.; OHI, H.; FUJITA, Y.; DA SILVA, N. J. Jr.; DE SIQUEIRA, R. J.; LAHLOU, S.; AIRD, S. D. A novel peptide from the ACEI/BPP-CNP precursor in the venom of *Crotalus durissus collilineatus*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol** v. 144, p. 107-21, 2006.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. A cell-based model of hemostasis. **Thromb Haemostasis** v. 85, p. 958-965, 2001.

HOSER, R. T. A reclassification of the rattlesnakes; species formerly exclusively referred to the the Genera *Crotalus* and *Sistrurus*. **Aust J Herpetol** v. 6, p. 1-21, 2009.

HOWGOOD, B. J. Crotoxin, the phospholipase A2 neurotoxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Mem Inst Butantan** v. 52, p. 21-22, 1990.

HUMMEL, B. C. W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. **Can J Biochem Cell B** v. 37, p. 1393-1399, 1959.

HUNG, C. C.; CHIOU, S. H.; Isolation of multiple isoforms of alpha-fibrinogenase from the Western diamondback rattlesnake *Crotalus atrox*: N-terminal sequence homology with ancrod, an antithrombotic agent from Malayan viper. **Biochem Biophys Res Commun** v. 201, p. 1414–1423. 1994.

HUTTON, R. A.; WARRELL, D. A. Action of snake venom components on the haemostatic system. **Blood Rev** v. 7, p.176-89, 1993.

ITOH, N., TANAKA, N., FUNAKOSHI, I., KAWASAKI, T., MIHASHI, S.,YAMASHINA, I. Organization of the gene for batroxobin, a trombina-simile snake venom enzyme. Homology with the trypsin/kallikrein gene family. **J Biol Chem** v. 263, p. 7628–7631, 1988a.

ITOH, N.; TANAKA, N.; FUNAKOSHI, I.; KAWASAKI, T.; MIHASHI, S.;YAMASHINA, I. The complete nucleotide sequence of the gene for batroxobin, a trombina-simile snake venom enzyme. **Nucleic Acids Res** v. 16, p. 10377–10378, 1988b.

IWASAKI, A.; SHIEH, T. C.; SHIMOHIGASHI, Y.; WAKI, M.; KIHARA, H.; OHNO, M. Purification and characterization of a coagulant enzyme, okinaxobin-I, from the venom of *Trimeresurus okinavensis* (himehabu snake) which releases fibrinopeptide-B. **Journal of Biochemistry** v. 108, p. 822-828, 1990.

JACKSON, K. The evolution of venom-conducting fangs: Insights from developmental biology. **Toxicon** v. 49, p. 975–981, 2007.

JIANG, X.; XU, J.; YANG, Q. Soluble expression, purification, and characterization of *Gloydius shedaoensis* venom gloshedobin in *Escherichia coli* by using fusion partners **Appl Microbiol Biotechnol** v. 85, p. 635–642, 2010.

JIANG, X.; CHEN, L.; XU, J.; YANG, Q. Molecular mechanism analysis of *Gloydius shedaoensis* venom gloshedobin interaction with inhibitors by homology modeling. **Int J Biol Macromol** v. 48, p. 129-133, 2011.

JIN, Y.; LU, Q. M.; CHEN, R. Q.; WU, J. B.; XIONG, Y. L. Molecular characterization of a weak fibrinogen-clotting enzyme from *Trimeresurus jerdonii* venom. **Toxicon** v. 45, p. 353-360, 2005.

JOSEPH, J. S.; CHUNG, M. C. M.; JEYASEELAN, K.; KINI, R. M. Trocarin, a toxin from *Tropidechis carinatus* venom structurally and functionally similar to blood coagulation factor Xa. **Thromb Haemostasis** p. 37-37, 1999.

KANNAN, H.; TANAKA, H.; UEDA, Y.; HAYASHIDA, Y.; KUNITAKE, T.; YAMASHITA, H. Effects of centrally administered endothelin-3 on renal sympathetic nerve activity and renal blood flow in conscious rats. **J Autonomic Nervous Sys** V. 49, p. 105-113, 1994.

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

KERKIS, A.; KERKIS, I.; RÁDIS-BAPTISTA, G. OLIVEIRA, E. B.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; PEREIRA, L. V.; YAMANE, T. Crota mine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **FASEB J** v. 18, p. 1407-1409, 2004.

KINI, R. M.; CHAN, Y. M. Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A2 enzymes. **J Mol Evol** v.48, p.125-32, 1999.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochem J** v. 97, p.377-87, 2006.

KINI, R. M. Toxins in thrombosis and haemostasis: potential beyond imagination. **J Thromb Haemostasis** v. 9, p. 195-208, 2011.

KISIEL, W. Molecular-properties of the factor V-activating enzyme from russells viper

venom. **J Biol Chem** v. 254, p. 2230-2234, 1979.

KISIEL, W.; CHOI, E.; KONDO, S. Isolation of a protein C activator from southern copperhead venom. **Biochem Biophys Res Commun** v. 143, p. 917-922, 1987.

KLAUBER, L. M. **Rattlesnakes: Their Habitats, Life Histories, and Influence on Mankind**. University of California Press: Berkeley, 1997.

KNIGHT, A.; STYLER, D.; PELIKAN, S.; CAMPBELL, J. A.; DENSMORE, L. D.; MINDRELL, D. P. Choosing among hypotheses of rattlesnake phylogeny: a best-fit rate test for DNA sequence data. **Systematics Biol** v. 42, p. 356-367, 1993.

KOCHVA, E. The origin of snakes and evolutionary of the venom apparatus. **Toxicon** v. 25, n.1, p. 65-106, 1986.

KOGANESAWA, N.; AIZAWA, T.; SHIMOJO, H.; MIURA, K.; OHNISHI, A.; DEMURA, M.; HAYAKAWA, Y.; NITTA, K.; KAWANO, K.; Expression and purification of a small cytokine growth-blocking peptide from armyworm *Pseudaletia separata* by an optimized fermentation method using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Express. Purif** v. 25, p. 416-425, 2002.

KOH, Y. S.; CHUNG, K. H.; KIM, D. S. Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom. **Toxicon** v. 39, p. 555-560, 2001.

KOMORI, Y.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H. Biochemical and physiological-studies on a kallikrein-like enzyme from the venom of *Crotalus viridis viridis* (prairie rattlesnake). **Biochim Biophys Acta** v. 967, p. 92-102, 1988.

KOMORI, Y.; NIKAI, T.; OHARA, A.; YAGIHASHI, S.; SUGIHARA, H. Effect of bilineobin, a thrombin-like proteinase from the venom of common cantil (*Agkistrodon bilineatus*). **Toxicon** v. 31, p. 257-270, 1993.

KOMORI, Y.; SAKAI, K.; MASUDA, K.; NIKAI, A. T. Isolation and Biochemical Characterization of Rubelase, a Non-Hemorrhagic Elastase from *Crotalus ruber ruber* (Red Rattlesnake) Venom. **Toxins (Basel)** v. 3, p. 900-10, 2011.

KRISHNASWAMY, S. Exosite-driven substrate specificity and function in coagulation. **J Thromb Haemost** v. 3, p. 54-67, 2005.

KRUSE, H.; GREIDANUS, V. W. Tj. B.; DE WIED, D. Barrel rotation induced by vasopressin and related peptides in rats. **Pharmacol Biochem Behav** v. 7, p. 311-313, 1977.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature** v. 227, p. 680-685, 1970.

LARABA-DJEBARI, F.; MARTIN-EAUCLAIRE M. F.; MARCHOT, P. A fibrinogen-clotting serine proteinase from *Cerastes cerastes* (horned viper) venom with arginine-esterase and amidase activities. Purification, characterization and kinetic parameter determination. **Toxicon** v. 30, p.1399–1410, 1992.

LAROCHE, Y.; STORME, V.; DE MUETTER, J.; MESSENS, J.; LAUWEREYS, M. High-level secretion and very efficient isotopic labeling of tick anticoagulant peptide (TAP) expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnology (NY)** v. 12, p. 1119–1124, 1994.

LEE, W. H.; ZHANG, Y.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L.; GAO, R. Isolation and properties of a blood-coagulation factor-X activator from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). **Toxicon** v. 33, p. 1263-1276, 1995.

LEE, J. W.; SEU, J. H.; RHEE, I. K.; JIN, I.; KAWAMURA, Y.; PARK, W. Purification and characterization of brevinase, a heterogeneous two-chain fibrinolytic enzyme from the venom of Korean snake, *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*. **Biochem Biophys Res Commun** v. 260, p. 665–670, 1999.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4 Ed. New York: W.H. Freeman. 2005.

LEVY, D. E.; DEL ZOPPO, G. J.; DEMAERSCHALK, B. M.; DEMCHUK, A. M.; DIENER, H. C.; HOWARD, G.; KASTE, M.; PANCIOLI, A. M.; RINGELSTEIN, E. B.; SPATAREANU, C.; WASIEWSKI, W. W. Ancrod_{in} acute ischemic stroke: results of 500 subjects beginning treatment within 6 hours of stroke onset in the ancrod stroke program. **Stroke** v. 40, p.3796-803, 2009.

LI, Z. F.; YU, X. L.; HUANG, J. L.; FANG, H. Q.; CHEN, H. P. Recombinant batroxobin expressed highly in *Pichia pastoris*. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao** v. 23, p. 483-6, 2007.

LIM, A.; BARNES, C. A. S. Utilization of Mass Spectrometry for the Structural Characterization of Biopharmaceutical Protein Products. In **protein and peptide Mass spectrometry In drug Discovery** (GROSS, M. L.; CHEN, G.; PRAMANIK, B. N. Eds.). John Wiley & Sons: New Jerseys, pp 287-315, 2012.

LIN, Y.; YU, X.; HE, Q.; LI, H.; LI.; SONG, X.; WANG, Y.; WEN, H.; DENG, H.; DENG, J. Expression and functional characterization of chitibrisin, a trombina-simile enzyme, in the venom of the Chinese green pit viper (*Trimeresurus albolabris*). **Protein Expr and Purif** v. 67, p. 48–52, 2009.

LIN, C. W.; CHEN, J. M.; WANG, Y. M.; WU, S. W.; TSAI, I. H.; KHOO, K. H. Terminal disialylated multiantennary complex-type N-glycans carried on acutobin define the glycosylation characteristics of the *Deinagkistrodon acutus* venom. **Glycobiology** v. 21, p. 530-542, 2011.

LIN-CEREGHINO, G. P.; CREGG, J. M. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. **Curr Opin Biotech** v. 10, p. 422-427, 1999.

LIN-CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Rev** v. 24, p. 45-66. 2000.

LIN-CEREGHINO, J.; LIN-CEREGHINO, G. P. Vectors and Strains for Expression. In **Methods in Molecular Biology: Pichia Protocols** (CREGG, J. M. Ed.). Humana Press Inc: Totowa, pp 11-25, 2007.

LIU, S.; SUN, M. Z.; SUN, C.; ZHAO, B.; GREENAWAY, F. T.; ZHENGE, Q. A novel serine protease from the snake venom of *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Toxicon** v. 52, p. 760-768, 2008.

LOMONTE, B.; GENÉ, J. A.; GUTIÉRREZ, J. M.; CERDAS, L. Estudio comparativo de los venenos de serpiente cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. **Toxicon** v. 21, p. 379-384, 1983.

LORD, S. T. Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis. **Curr Opin Hematology** v. 14, p. 236-241, 2007.

LU, Q.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. Snake venoms and hemostasis. **J Thromb Haemostasis** v. 3, p. 1791-1799, 2005.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast** v. 22, p. 249-270, 2005.

MACFARLANE, R. G. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function as a Biological Amplifier. **Nature** v. 202, p. 498 – 499, 1964.

MACKESSY, S. P. Venom Composition in Rattlesnakes: Trends and Biological Significance. In: **The Biology of Rattlesnakes**. (HAYES, W.K.; BEAMAN, K.R.; CARDWELL, M.D.; BUSH, S.P. Eds.), Loma Linda University Press: Loma Linda, CA, pp. 495-510. 2008.

MACKESSY, S. Trombina-simile Enzymes in Snake Venoms. In **Toxins and Hemostasis** (KINI, R. M. CLEMETSON, K.J.; MARKLAND, F.S.; MCLANE, M.A.; MORITA, T. Eds.), London: Springer, pp. 518-558, 2010.

MAEDA, M.; SATOH, S.; SUZUKI, S.; NIWA, M.; ITOH, N.; YAMASHINA, I. Expression of cDNA for batroxobin, a trombina-simile snake venom enzyme. **J Biochem (Tokyo)** v. 109, 632-637. 1991.

MAGALHÃES, A.; FERREIRA, R. N.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S.; YARLEQUE, A.; MAGALHÃES, H. P. B.; BLOCH, C.; SANCHEZ, E. F. Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes. **Comp Biochem Phys B** v. 136, p. 255-266, 2003.

MAGALHÃES, A.; MAGALHÃES, H. P. B.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S.; FERREIRA, R. N.; ALMEIDA, A. P.; SANCHEZ, E. F. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comp Biochem Phys A** v. 146, p. 565-575, 2007.

MARKLAND, F. S.; DAMUS, P. S. Purification and properties of a thrombin-like enzyme from venom of *Crotalus adamanteus* (eastern diamondback rattlesnake). **J Biol Chem** v. 246, p. 6460-6473, 1971.

MARKLAND, F. S.; KETTNER, C.; SCHIFFMAN, S.; SHAW, E.; BAJWA, S. S.; REDDY, K. N. N.; KIRAKOSSIAN, H.; PATKOS, G. B.; THEODOR, I.; PIRKLE, H. Kallikrein-like activity of crotalase, a snake venom enzyme that clots fibrinogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United** v. 79, p. 1688-1692, 1982.

MARKLAND Jr, F.S. Inventory of K and L fibrinogenases from snake venom. **Thromb Haemost** v. 65, p. 438-443, 1991.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the haemostatic system. **Toxicon** v.36, p. 1749-1800, 1998a.

MARKLAND Jr, F.S. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. **Thromb Haemost** v. 79, p. 668-674, 1998b.

MARRAKCHI, N.; ZINGALI, R. B.; KAROUI, H.; BON, C.; EL AYEB, M. Cerastocytin, a new trombina-simile platelet activator from the venom of the Tunisian viper *Cerastes cerastes*. **Biochim Biophys Acta** v. 1244, p. 147–156, 1995.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon** v. 45, p. 1171-1181, 2005.

MARTINS, A. M. C.; TOYAMA, M. H.; HAVT, A.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. **Toxicon** v. 40, p. 1165-71, 2002.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **BBA-Protein Struct M** v. 1477, p. 146-156, 2000.

MCDIARMID, R. W.; CAMPBELL, J. A.; TOURÉ, T.A. **Snake Species of the World: A Taxonomic and Geographical Reference**. The Herpetologists' League: Washington, DC, 1999.

MENALDO, D. L.; BERNARDES, C. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; MOURA, L. A.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V. Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom. **Biochimie** v. 94, p. 2545-2558, 2012.

MINISTERIO DA SAÚDE – Histórico do ofidismo, 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/historico_ofidismo.pdf>. Acesso em 20 jan 2013.

MUANPASITPORN, C.; ROJNUCKARIN, P. Expression and characterization of a recombinant fibrinogenolytic serine protease from green pit viper (*Trimeresurus albolabris*) venom. **Toxicon** v. 49, p. 1083-1089, 2007.

MUKHERJEE, A. K.; MACKESSY, S. P. Biochemical and pharmacological properties of a new thrombin-like serine protease (Russelobin) from the venom of Russell's Viper (*Daboia russelii russelii*) and assessment of its therapeutic potential. **Biochim Biophys Acta** 2013. *In Press*

MURPHY, R. W.; FU, J.; LATHROP, A.; FELTHAM, J. V.; KOVAC, V. Phylogeny of the rattlesnakes (*Crotalus* and *Sistrurus*) inferred from sequences of five mitochondrial DNA genes. In **Biology of the Vipers**. (HÖGGREN, M.; SCHUETT, G.W.; GREENE, H.; DOUGLAS, M.E., Eds.) Eagle Mountain Publishing: Eagle Mountain, UT, pp 69–92, 2002.

NIEWIAROWSKI, S.; KIRBY, E. P.; BRUDZYNSKI, T. M.; STOCKER, K. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. **Biochemistry** v. 18, p. 3570–3577, 1979.

NIKAI, T.; OHARA, A.; KOMORI, Y.; FOX, J. W.; SUGIHARA, H. Primary structure of a coagulant enzyme, bilineobin, from *Agkistrodon bilineatus* venom. **Arch Biochem Biophys** v. 318, p. 89-96, 1995.

NIKANDROV, N. N. DESHIMARU, M.; TANI, A.; CHIJIWA, T.; SHIBATA, H.; CHANG, C. C.; FUKUMAKI, Y.; ITO, T.; OHNO, M. Purification, primary structures and evolution of coagulant proteases from *Deinagkistrodon actus* venom. **Toxicon** v. 46, p. 907-917, 2005.

NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OZAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A.; FUKUI, H. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry** v. 33, p. 1843-1849, 1994.

NOBUHISA, I.; NAKASHIMA, K.; DESHIMARU, M.; OGAWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; SAKAKI, Y.; HATTORI, S.; KIHARA, H.; OHNO, M. Accelerated evolution of *Trimeresurus okinavensis* venom gland phospholipase A2 isozyme-encoding genes. **Gene** v. 172, n. 2, p. 267-72, 1996.

NOLAN, C.; HALL, L. S.; BARLOW, G. M. Ancrod, the coagulating enzyme from Malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom. **Methods Enzymol** v. 45, p. 205-213, 1976.

NUSTAD, K.; ORSTAVIK, T. B.; GAUTVIK, K. M.; PIERCE, J. V. Glandular kallikreins. **General Pharmacology** v. 9, p. 1-9, 1978.

OGAWA, T.; NAKASHIMA, K.; NOBUHISA, I.; DESHIMARU, M.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; SAKAKI, Y.; HATTORI, S.; OHNO, M. Accelerated evolution of snake venom phospholipase A2 isozymes for acquisition of diverse physiological functions. **Toxicon** v.34, p.1229-36, 1996.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crothamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon** v. 46, p. 363–370, 2005.

OLIVEIRA, D. G. L.; MURAKAMI, M. T.; CINTRA, A. C. O.; FRANCO, J. J.; SAMPAIO, S. V.; ARNI, R. K.; Functional and structural analysis of two fibrinogen-activating enzymes isolated from the venoms of *Crotalus durissus terrificus* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Acta Bioch Bioph Sin** v. 41, p. 21-29, 2009.

OSHIMA-FRANCO, Y.; HYSLOP, S.; PRADO, J. F.; CRUZ-HOFFLING, M. A.; RODRIGUEZ, L. S. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South-American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin. **Toxicon** v. 37, p. 1341-1357, 1999.

OUYANG, C.; TENG, C. M.; HUANG, T. F. Characterization of snake venom principles affecting blood coagulation and platelet aggregation. **Adv Exp Med Biol** v. 281, p. 151-163, 1990.

OYAMA, E.; TAKAHASHI, H. Purification and characterization of a thrombin like enzyme, elegaxobin II, with lys-bradykinin releasing activity from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima Habu). **Toxicon** v. 41, p. 559-568, 2003.

PAES-LEME, A. F.; PREZOTO, B. C.; YAMASHIRO, E. T.; BERTHOLIM, L.; TASHIMA, A. K.; KLITZKE, C. F.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. T. *Bothrops* protease A, a unique highly glycosylated serine proteinase, is a potent, specific fibrinogenolytic agent. **J Thromb Haemost** v. 6, p. 1363-1372, 2008.

PAN, H.; DU, X.; YANG, G.; ZHOU, Y.; WU, X. cDNA cloning and expression of acutin. **Biochem Biophys Res Commun** v. 255, p. 412-415, 1999.

PANDYA, B. V.; CIERNIEWSKI, C. S.; BUDZYNSKI, A. Z. Conservation of human-fibrinogen conformation after cleavage of the B-beta chain NH2 terminus. **J Biol Chem** v. 260, p. 2994-3000, 1985.

PARK, D.; KIM, H.; CHUNG, K.; KIM, D.S.; YUN, Y. Expression and characterization of a novel plasminogen activator from *Agkistrodon halys* venom. **Toxicon** v. 36, p. 1807-1819, 1998.

PARKINSON, C. L. Molecular systematics and biogeographical history of pitvipers as determined by mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Copeia** v. 1999, 576-586, 1999.

PARKINSON, C. L.; CAMPBELL, J. A.; CHIPPINDALE, P. Multigene phylogenetic analysis of pitvipers, with comments on their biogeography. In **Biology of the Vipers**. (HÖGGREN, M.; SCHUETT, G.W.; GREENE, H.; DOUGLAS, M.E., Eds.) Eagle Mountain Publishing: Eagle Mountain, UT, pp 93-110, 2002.

PARRY, M. A.; JACOB, U.; HUBER, R.; WISNER, A.; BON, C.; BODE, W. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. **Structure** v. 6, p. 1195-1206, 1998.

PATÍÑO, A. C.; PEREAÑEZ, J. A.; GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADOC, A. Biochemical and biological characterization of two serine proteinases from Colombian *Crotalus durissus cumanensis* snake venom. **Toxicon** v. 63, p. 32–43, 2013.

PETRETSKI, J. H.; KANASHIRO, M.; SILVA, C. P.; ALVES, E. W.; KIPNIS, T. L. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. **Braz J Med Biol Res** v. 33, p. 1293-1300, 2000.

PINHO, F. M. & PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev Ass Méd Brás** v. 47, n.1, p. 24-29, 2001.

PIRKLE, H.; THEODOR, I. Trombina-simile venom enzymes: structure and function. **Adv Exp Med Biol** v. 281, p.165-174, 1990.

PIRKLE, H.; STOCKER, K. Trombina-simile enzymes from snake venoms: an inventory. **Thromb Haemost** v. 65, p. 444-450, 1991.

PIRKLE, H. Trombina-simile enzymes from snake venoms: an update inventory. **Thromb Haemost** v. 79, p.675–683, 1998.

PLACE, A. J.; ABRAMSON, C. I. A quantitative analysis of the ancestral area of rattlesnakes. **J Herpetology** v. 38, p. 152–156, 2004.

POLGÁR, L. On the mechanism of proton transfer in the catalysis by serine proteases. **J Theor Biol** v. 31, p.165-9, 1971.

PONCE-SOTO, L. A.; BONFIM, V. L.; NOVELLO, J. C.; OVIEDO, R. N.; CHOCAS, A. Y.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of a serine protease, BaIII-4, from peruvian *Bothrops atrox* venom. **Protein Journal** v. 26, p. 387-394, 2007.

PONCE-SOTO, L. A.; TOYAMA, M. H.; HYSLOP, S.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilinetus* venom. **J Protein Chem.** v. 21, p. 131-136, 2002.

PORRO, D.; SAUER, M.; BRANDUARDI, P.; MATTANOVICH, D. Recombinant protein production in yeasts. **Mol Biotechnol** v. 31, p. 245-259, 2005.

QUIJADA-MARCAREÑAS, J. A.; WÜSTER, W. On the origins and dispersal of the neotropical rattlesnakes in South America. **CAH/ACH Bulletin** v. 14, p. 6-12, 2006.

RADOSEVICH, M.; GOUBRAN, H. A.; BURNOUF, T. Fibrin sealant: Scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. **Vox Sanguinis** v. 72, p. 133-143, 1997.

RADVANYI, F.; SALIOU, B.; LAMBEZAT, M. P.; BON, C. Binding of crotoxin, a presynaptic phospholipase A₂ neurotoxin, to negatively charged phospholipids vesicles. **J Neurochemistry** v. 53, n. 4, p. 1254-1260, 1989.

RAO, V. S.; KINI, R. M. Pseutarin C, a prothrombin activator from *Pseudonaja textilis* venom: Its structural and functional similarity to mammalian coagulation factor Xa-Va complex. **Thromb Haemost** v. 88, p. 611-619, 2002.

RAW, I.; ROCHA, M. C.; ESTEVES, M. I.; KAMIGUTI, A. S. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Braz J Med Biol Res** v. 19, p. 333-338, 1986.

ROCKWELL, N. C.; KRYSAN, D. J.; KOMIYAMA, T.; FULLER, R. S. Precursor Processing by Kex2/Furin Proteases. **Chem Rev** v. 102, p. 4525-4548, 2002.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of newiedase, a non hemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake venom. **Arch Biochem Biophys** v. 381, p. 213-224, 2000.

ROSING, J.; GOVERS-RIEMSLAG, J. W.; YUKELSON, L.; TANS, G. Factor V activation and inactivation by venom proteases. **Haemostasis** v. 31, p. 241-246, 2001.

ROWE, S. L.; STEGEMANN, J. P. Microstructure and Mechanics of Collagen-Fibrin Matrices Polymerized Using Ancrod Snake Venom Enzyme. **J Biotech Eng-T Asme** v. 131, 2009.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIZAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon** v. 57, p. 627-645, 2011.

SÁNCHEZ, E. E.; GALÁN, J. A.; RUSSELL, W. K.; SOTO, J. G.; RUSSELL, D. H.; PÉREZ, J. C. Isolation and characterization of two disintegrins inhibiting ADP-induced human platelet aggregation from the venom of *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mohave Rattlesnake). **Toxicol Appl Pharmacol** v. 212, p. 59-68, 2006.

SANTORO, M. L.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; GONÇALVES, L. R. C.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; CARDOSO, D. F.; LAPORTA-FERREIRO, L. I.; SAIKI, M.; PERES, C.

A.; SANO-MARTINS, I. S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of South-American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*. **Comp Biochem Physiol** v. 122C, p. 61-73, 1999.

SAPRU, Z. Z.; TU, A. T.; BAILEY, G. S. Purification and characterization of a fibrinogenase from the venom of western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). **Bioch Bioph Acta** v. 747, n. 3, p. 225-231, 1983.

SARAVIA, P.; ROJAS, E.; ARCE, V.; GUEVARA, C.; LÓPEZ, J. C.; CHAVES, E.; VELÁSQUEZ, R.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M. Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. **Rev Biol Trop** v. 50, p. 337-346, 2002.

SCHILLING, S.; HOFFMANN, T.; ROSCHE, F.; MANHART, S.; WASTERNAK, C.; DEMUTH, H. U. Heterologous expression and characterization of human glutamyl cyclase: Evidence for a disulfide bond with importance for catalytic activity. **Biochemistry** v. 41, p. 10849-10857, 2002.

SCORER, C. A. CLARE, J. J.; MCCOMBIE, W. R.; ROMANOS, M. A.; SREEKRISHNA, K. Rapid selection using g418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. **Bio-Technology** v. 12, p. 181-184, 1994.

SELISTRE, H. S.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca-ilhoa). **Toxicon** v. 25, p. 1135-1144, 1987.

SERRANO, S.M.; HAGIWARA, Y.; MURAYAMA, N.; HIGUCHI, S.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C.A.; CAMARGO, A.C.; FINK, E. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. **Eur J Biochem** v. 251, p. 845-853, 1998.

SERRANO, S. M. T.; SAMPAIO, C. A. M.; MENTELE, R.; CAMARGO, A. C. M.; FINK, E. A novel fibrinogen-clotting enzyme, TL-BJ, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: Purification and characterization. **Thromb Haemostasis** v. 83, p. 438-444, 2000.

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

SHIMOKAWA, K.; SHANNON, J. D.; JIA, L. G.; FOX, J. W. Sequence and biological activity of catrocollastatin-C: a disintegrin-like/cysteine-rich two-domain protein from *Crotalus atrox* venom. **Arch Biochem Biophys** v. 343, p. 35-43, 1997.

SHIMOKAWA, K.; JIA L, G.; SHANNON, J. D.; FOX, J. W. Isolation, sequence analysis, and biological activity of atrolysin E/D, the non-RGD disintegrin domain from *Crotalus atrox* venom. **Arch Biochem Biophys** v. 354, p. 239-46, 1998.

SHU, Y. Y.; MORAN, J. B.; GEREN, C. R. A thrombin-like enzyme from timber rattlesnake venom. **Biochim Biophys Acta** v. 748, p. 236-244, 1983.

SHUKLA, A. K.; HAASE, W.; REINHART, C.; MICHEL, H. Heterologous expression and comparative characterization of the human neuromedin U subtype II receptor using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and mammalian cells. **Int J Biochem Cell Biol** v. 39, p. 931-942, 2007.

SIIGUR, E.; MAHAR, A.; SIIGUR, J. Beta-fibrinogenase from the venom of *Vipera lebetina*. **Toxicon** v. 29, p. 107-118, 1991.

SIIGUR, E.; SAMEL, M.; TANISMAGI, K.; SUBBI, J.; REINTAMM, T.; SIIGUR, J. Isolation, properties and N-terminal amino acid sequence of a factor V activator from *Vipera lebetina* (Levantine viper) snake venom. **Biochim Biophys Acta-P Struct Mol Enzymol** v. 1429, p. 239-248, 1998.

SILVA, J. A.; SPENCER, P.; CAMILLO, M. A.; DE LIMA, V. M. Gyroxin and its biological activity: effects on CNS basementmembranes and endothelium and protease-activated receptors. **Curr Med Chem** v. 9, p. 281-91, 2012.

SILVA-JUNIOR, F. P.; DE-SIMONE, S. G. S1 subsite in snake venom thrombin-like enzymes: can S1 subsite lipophilicity be used to sort binding affinities of trypsin-like enzymes to small-molecule inhibitors. **Bioorg Med Chem** v. 12, p. 2571-2587, 2004.

SILVA-JUNIOR, F. P.; FLORIANO P.; GUEDES, H. L. M.; GARVEY, L. C.; AGUIAR, A. S.; BOURGUIGNON, S. C.; DI CERA, E.; GIOVANNI-DE-SIMONE, S. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the *Bothrops jararacussu* venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility. **Toxicon** v. 50, p. 18-31, 2007.

SREEKRISHNA, K.; BRANKAMP, R. G.; KROPP, K. E.; BLANKENSHIP, D. T.; TSAY, J. T.; SMITH, P. L.; WIERSCHKE, J. D.; SUBRAMANIAM, A.; BIRKENBERGER, L. A. High-level expression, purification, and characterization of recombinant human-tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Biochemistry** v. 28, p. 4117-4125, 1989.

SREEKRISHNA, K.; NELLES, L.; POTENZ, R.; CRUZE, J.; MAZZAFERRO, P.; FISH, W.; FUKU, M.; HOLDEN, K.; PHELPS, D.; WOOD, P.; PARKER, K. Strategies for optimal

synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene** v. 190, p. 55-62, 1997.

STOCKER, K.; BARLOW, G.H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin). **Meth Enzym** v. 45, p. 214–223, 1976.

STUBBS, M.T.; BODE, W. A player of many parts: the spotlight falls on thrombin structure. **Thromb Res** v. 69, p. 1–58, 1993.

TANG, S. S.; ZHANG, J. H.; TANG, B. S.; TANG, Z. H.; LI, H. Z.; YUAN, H. J.; CHUI, S. L.; ZHAO, E. Y. Biochemical and Hemostatic Mechanism of A Novel Thrombin-Like Enzyme. **Thrombosis Research** v. 124, p. 631-639, 2009.

TOKUNAGA, F.; IWANAGA, S. Proteases activating factor V. **Enzymes from snake venom** p. 209-225, 1998.

TORII, S.; NAITO, M.; TSURUO, T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom. **J Biol Chem** v. 272, p. 9539-42, 1997.

TOYAMA, M. H.; CARNEIRO, E. M.; MARANGONI, S.; BARBOSA, R. L.; CORSO, G.; BOSCHERO, A. C. Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolates by single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (south American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islet. **Biochim Biophys Acta** v. 1474, p. 56-60, 2000.

TOYAMA, M. H.; CARNEIRO, E. M.; MARANGONI, S.; AMARAL, M. E. C.; VELLOSO, L. A.; BOSCHERO, A. C. Isolation and characterization of a convulxin-like protein from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **J Protein Chem.** v. 20, p. 585-91, 2001.

TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. DE O.; PASSERO, L. F.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; TOMOKANE, T. Y.; FONSECA, F. V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O.; MARTINS, M. A.; MONTEIRO, H. S.; FONTELES, M. C. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon** v. 47, p. 47-57, 2006.

TSCHOPP, J. F.; SVERLOW, G.; KOSSON, R.; CRAIG, W.; GRINNA, L. High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnology (NY)**. v. 5, p. 1305–1308, 1987.

TU, A. T. Overview of snake venom chemistry, **Adv Exp Med Biol** v. 391, p. 37-62, 1996.

TU, A. T.; BAKER, B.; WONGVIBULSIN, S.; WILLIS, T. Biochemical characterization of atroxase and nucleotide sequence encoding the fibrinolytic enzyme. **Toxicon** v. 34, p. 1295-300, 1996.

VALERIANO-ZAPANA, J. A.; STEVE, S. C. F.; MIGUEL, R. H. J.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S. Functional and structural characterization of a new serine protease with thrombin-like activity TLBan from *Bothrops andianus* (Andean Lancehead) snake venom. **Toxicon** v. 59, p. 231-240, 2012.

VARGAS, L. J.; QUINTANA, J. C.; PEREAÑEZ, J. A.; NÚÑEZ, V.; SANZ, L.; CALVETE, J. Cloning and characterization of an antibacterial l-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cumanensis* venom. **Toxicon** v. 64, p. 1-11, 2012.

VILCA-QUISPE, A.; PONCE-SOTO, L. A.; WINCK, F. V.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. **Toxicon** v. 55, p. 745-753, 2010.

VINE, A. K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. **Retina-J Ret Vit Dis** v. 29, p. 1-7, 2009.

VONK, F. J.; ADMIRAAL, J. F.; JACKSON, K.; RESHEF, R.; DE BAKKER, M. A. G.; VANDERSCHOOT, K.; VAN DEN BERGE, I.; VAN ATTEN, M.; BERGERHOUT, E.; BECK, A.; MIRTSCHEIN, P.J.; KOCHVA, E.; WITTE, F.; FRY, B.G.; WOODS, A.E.; RICHARDSON, M.K. Evolutionary origin and development of snake fangs. **Nature** v. 454, p. 630-633, 2008.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks. **Nat Biotech** v. 24, p. 769-776, 2006.

WANG, Y. M.; WANG, S. R.; TSAI, I. H. Serine protease isoforms of *Deinagkistrodon acutus* venom: cloning, sequencing and phylogenetic analysis. **Biochem J** v. 354, p.161-168, 2001.

WARRELL, D. Snake bite. **Lancet** v. 375, p. 77-88, 2010.

WARRELL, D. Venomous Bites, Stings, and Poisoning. **Infect Dis Clin N Am** v. 26, p. 207-223, 2012.

WELLNER, D.; MEISTER, A. Crystalline L-amino acid oxidase of *Crotalus adamanteus*. **J Biol Chem** v. 235, p. 2013-2018, 1960.

WILLIAMS D.; GUTIÉRREZ, J. M.; HARRISON, R.; WARRELL, D. A.; WHITE, J.; WINKEL, K.; GOPALAKRISHNAKONE, P. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **Lancet** v. 375, p. 89–91, 2010.

World Health Organization, International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 2007. Disponível em: <<http://apps.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/>>, Acesso em 10 dez. 2012.

WU, W. B.; PENG, H. C.; HUANG, T. F. Crotalin, a vWF and GP Ib cleaving metalloproteinase from venom of *Crotalus atrox*. **Thromb Haemost** v. 86, p. 1501-11, 2001.

WU, J.; JIN, Y.; ZHONG, S.; CHEN, R.; ZHU, S.; WANG, W.; LU, Q.; XIONG, Y. A unique group of inactive serine protease homologues from snake venom. **Toxicon** 52, 277–284. 2008.

WÜSTER, W.; SALOMÃO, M. G.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J. A.; THORPE, R. S. Origins and evolution of the South American pit viper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In: **Biology of the Vipers**. (SCHUETT, G. W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M. E; GREENE, H. W. Eds.), Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountain, UT, pp 111–128, 2002.

WÜSTER, W.; FERGUSON, J. E.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J. A.; POOK, C. E.; SALOMÃO, M. G.; THORPE, R.S. Tracing an invasion: landbridges, refugia and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). **Molecular Ecology** v. 14, p. 1095-1108, 2005.

WÜSTER, W; PEPPIN, L; POOK, C. E.; WALKER, D. E. A nesting of vipers: Phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). **Mol Phylogenetics and Evolution** v. 49, p. 445-459, 2008.

WÜSTER, W.; BERNILS, R. S. On the generic classification of the rattlesnakes, with special reference to the Neotropical *Crotalus durissus complex* (Squamata: Viperidae). **Zoologian** v. 28, 2011. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-46702011000400001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 14 de dezembro de 2011.

XU, G.; LIU, X.; ZHU, W.; YIN, Q.; ZHANG, R.; FAN, X. Feasibility of treating hyperfibrinogenemia with intermittently administered batroxobin in patients with ischemic

stroke/transient ischemic attack for secondary prevention. **Blood Coagul Fibrin** v. 18, p. 193-197, 2007.

YANG, Q.; HU, X. J.; XU, X. M.; AN, L. J.; YUAN, X. D.; SU, Z. G. Cloning, Expression and Purification of Gussurobin, A Trombina-simile Enzyme from the Snake Venom of *Gloydius ussuriensis*. **Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao** v. 34, p. 6-10, 2002.

YANG, Q.; LI, M.; XU, J.; BAO, Y.; LEI, X.; AN, L. Expression of glosedobin, a trombina-simile enzyme from the venom of *Gloydius shedaoensis*, in *Escherichia coli*. **Biotech Lett** v. 25, p.101-4, 2003.

YANG, D.; PENG, M.; YANG, H.; YANG, Q.; XU, J. Expression, purification and characterization of *Gloydius shedaoensis* venom glosedobin as Hsp70 fusion protein in *Pichia pastoris*. **Prot Exp Purif** v.66, p.138–142, 2009.

YONAMINE, C. M.; PRIETO-DA-SILVA, A. R. B.; MAGALHÃES, G. S.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; MORGANTI, L.; AMBIEL, F. C.; CHURA-CHAMBI, R. M.; YAMANE, T.; CAMILLO, M. A. P. Cloning of serine protease cDNAs from *Crotalus durissus terrificus* venom gland and expression of a functional Gyroxin homologue in COS-7 cells. **Toxicon** v. 54, p.110–120, 2009.

YONAMINE, C. M.; KONDO, M. Y.; JULIANO, M. A.; ICIMOTO, M. Y.; BAPTISTA, G. R.; YAMANE, T.; OLIVEIRA, V.; JULIANO, L.; LAPA, A. J.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; HAYASHI, M. A. F. Kinetic characterization of gyroxin, a serine protease from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochimie** v. 94, p. 2791-2793, 2012.

YOU, W. K.; CHOI, W. S.; KOH, Y. S.; SHIN, H. C.; JANG, Y.; CHUNG, K. H. Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom trombina-simile enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. **FEBS Letters** v. 571, p. 67–73, 2004.

YU, X.; LI, Z.; XIA, X.; FANG, H.; ZHOU, C.; CHEN, H. Expression and purification of ancrod, an anticoagulant drug, in *Pichia pastoris*. **Protein Express. Purif** v. 55, p. 257-261, 2007.

YUAN, S.; WANG, P.; TAO, H.; ZHAN, D.; WANG, Y.; WANG, L.; LIU, C.; ZHANG, Z. Expression of snake venom thrombin-like enzyme calobin in *Pichia pastoris*. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao** v. 25, p. 526-32, 2009.

ZHA, X. D.; REN, B.; LIU, J.; XU, K. S. cDNA cloning and high-level expression of a trombina-simile enzyme from *Agkistrodon acutus* venom. **Methods Find Exp Clin Pharmacol** v. 25, p. 253-7, 2003.

ZHANG, Y.; XIONG, Y. L.; BON, C. An activator of blood-coagulation factor-X from the venom of *Bungarus fasciatus*. **Toxicon** v. 33, p. 1277-1288, 1995.

ZHANG, Y.; WISNER, A.; MAROUN, R.C.; CHOUMET, V.; XIONG, Y.; BON, C. *Trimeresurus stejnegeri* snake venom plasminogen activator Site-directed mutagenesis and molecular modeling. **J Biol Chem** v. 272, p. 20531–20537, 1997.

ZHANG, L.; LU, S. H.; LI, L.; TAO, Y. G.; WAN, Y. L.; SENG, H.; YANG, R.; HAN, Z. C. Batroxobin Mobilizes Circulating Endothelial Progenitor Cells in Patients With Deep Vein Thrombosis. **Clin Appl Thromb-Hem** v. 17, p. 75-79, 2011a.

ZHANG, S. T.; FANG, H. M.; ZHAO, L.; TIAN, Q. N.; QIN, Y. F.; LU, P.; CHEN, S. J.; BAO, Z. X.; LIANG, F. Co-overexpression of PpPDI Enhances Secretion of Ancrod in *Pichia pastoris*. **Appl Biochem Biotech** v. 164, p. 1037-1047, 2011b.

ZHU, Z. L.; LIANG, Z.; ZHANG, T. Y.; ZHU, Z. Q.; XU, W. H.; TENG, M. K.; NIU, L. W. Crystal structures and amidolytic activities of two glycosylated snake venom serine proteinases. **J Biol Chem** v. 280, p. 10524-10529, 2005.