

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Expressão de Fabs específicos para  
peçonha de *Bothrops atrox* em *Pichia  
pastoris***

**Tayana Kariya dos Santos**

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Brasília – DF

Abril de 2012

Tayana Kariya dos Santos

**Expressão de *Fabs* específicos para  
peçonha de *Bothrops atrox* em *Pichia  
pastoris***

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biologia Molecular.

Brasília – DF

Abril de 2012

Tayana Kariya dos Santos

**Expressão de *Fabs* específicos para peçonha de *Bothrops atrox* em *Pichia pastoris***

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Universidade de Brasília

Abril de 2012

**Banca Examinadora:**

Dra. Márcia Renata Mortari - UnB

Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes – UnB

Dra. Andréa Queiroz Maranhão - UnB

Dr. Marcelo de Macedo Brígido - UnB

Dra. Wanessa Araújo Carvalho – UnB

Trabalho desenvolvido no laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, sob a orientação da Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão.

Este trabalho é dedicado aos meus amados pais, amigos e namorado, por todo apoio e confiança que depositaram em mim.

## Agradecimentos

Primeiramente a Deus por sempre iluminar meus caminhos e auxiliar-me nos momentos necessários, permitindo muitas superações e realizações.

Aos meus pais, Ademir e Elisa, por todo apoio que me ofereceram durante minha vida e pelo incentivo contínuo para que eu sempre faça aquilo que gosto, mesmo que, para vocês, isso significasse me sustentar por mais alguns anos (e realmente significou). Obrigada mãe por estar sempre disposta a ouvir meus relatos, bons ou ruins, mesmo não entendendo nada e pelas palavras que me confortaram. Obrigada pai por interessar-se pelo meu trabalho e por me ensinar tantas coisas, principalmente que é preciso querer continuar aprendendo para o resto de nossas vidas. Vocês são meus heróis. Amo-os demais!!

Aos meus orientadores, Andréa e Marcelo, por todo conhecimento que me passaram e pela atenção e paciência que sempre tiveram comigo e com o meu trabalho. Obrigada por me ensinar a buscar, por mim mesma, soluções para os problemas antes de procurá-las com vocês!! Esse é o maior aprendizado que vou levar para minha vida.

Ao CNPq e à CAPES por financiarem meu trabalho.

Aos professores do Laboratório de Biologia Molecular: Lídia pelos muitos conselhos sobre como trabalhar com *Pichia pastoris*, pois foram fundamentais para eu conseguir realizar meu projeto; Fernando também por ajudar a trabalhar com *Pichia*; Élide, Márcio, Ildinete por estarem sempre disponíveis para ajudar. E também à professora Beth pela ajuda com a peçonha.

À minha “mãezona” no lab., Kelly Simi, que me ensinou quase tudo o que eu sei sobre Biologia Molecular. Muito obrigada pela ajuda para pensar e planejar experimentos, pela paciência em me explicar tudo direitinho e pela disposição para ajudar sempre (até nos finais de semana). Você é uma grande amiga/mãe.

Aos meus loucos amigos companheiros de laboratório: Mary pelas suas histórias “alucicrazy” que me fazem morrer de rir (espero que nesse ano de 2012 você consiga ser uma pessoa melhor - kkkkk); Fê que também faz a alegria do lab. (valeu

garotinha!!); Rafa pelas muitas ajudas e pela divertida companhia; Galina por ser a pessoa mais prestativa do lab; Jana por, sempre que está na área, divertir o pessoal; Barbarela por me ajudar com as dúvidas sobre peçonha e *Pichia pastoris*; Yuri por sempre ligar o ar condicionado em -80 °C, brincadeira, por ajudar a entender algumas técnicas; Flavinha pelos conselhos sobre *Pichia* e sobre homens; Wan por ajudar a sanar minhas dúvidas; Herdson por também trabalhar aos finais de semana e assim me fazer companhia. Sem vocês esse mestrado não teria a menor graça.

Às queridas Dona Fátima e Dona Ivanildes e ao Thompson que sempre ajudaram e tiveram paciência comigo e com os meus materiais que precisavam de 40 minutos de autoclavagem e atrapalhava todo o esquema deles.

Aos colegas dos outros laboratórios que também ajudaram em diversos momentos de necessidade (salvaram minha vida): Marciano, Robson, Natália, Túlio, Osmar, Vivis, Nádia, Gisele, Vinícius, Janice, Juliana. Theíssa, Bruno, Zé Carlos, Érica, Adriane, Marcos e Carol.

Às minhas amadas amigas Mari, Lari, Rê, Insaci e Sandri (que se foi antes da hora e deixou muita saudade) por me dar força nos momentos de fraqueza, pelas intermináveis conversas à toa, pelos divertidíssimos Dias Gordos, pelos filmes, pelos churrascos (até na laje e debaixo de chuva) com o melhor do Sertanejo ao vivo (Mineira, Baiano e Mindu) e pelas festas. Enfim pela amizade que sempre me ajudou a encarar as dificuldades do trabalho e da vida. Amo todas vocês.

À minha linda e louca família que está tão longe e sinto muitas saudades.

E por último, mas não menos importante, ao meu lindo, Juliano, que aturou o meu mau humor quando as coisas não davam certo no laboratório, que foi tantas vezes ao lab comigo (à noite, aos fins de semana, de madrugada e até no meio de festas) só pra eu não ficar sozinha, que me escutou inúmeras vezes falando de assuntos laboratoriais sobre os quais não fazia a menor idéia do que se tratava e muito mais. Obrigada por ser meu ombro amigo, meu companheiro, meu amor. Amo-te!!

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TERMOS E ABREVIATURAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1. Acidentes ofídicos .....	1
1. 1. Acidentes botrópicos.....	4
2. A Soroterapia .....	6
3. A busca por novos tratamentos .....	8
4. Imunoglobulinas .....	9
5. Seleção de anticorpos de interesse.....	13
6. Expressão heteróloga de anticorpos e seus fragmentos .....	13
7. <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expressão heteróloga .....	14
8. O presente trabalho.....	15
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
1. Linhagens celulares .....	18
1. 1. <i>Escherichia coli</i> .....	18
1. 2. <i>Pichia pastoris</i> .....	18
2. Plasmídeos .....	19
2. 1. pGEM-T Easy (Promega).....	19
2. 2. pGEM-T Easy Fab (Simi, 2009) .....	20
2. 3. pPIgLe Fab (Burtet, 2007).....	21
3. Oligonucleotídeos.....	22
4. Amplificação dos segmentos gênicos codificadores dos domínios VH e VL por PCR.....	24
5. Digestão enzimática (Adaptado de Azevedo <i>et al</i> , 2003).....	25
5. 1. Endonucleases de restrição utilizadas nesse trabalho .....	25
6. Eletroforese em gel de agarose (Adaptado de De-Souza em Azevedo <i>et al</i> , 2003).....	26
6. 1. Análise de DNA plasmidial em gel de agarose.....	27

6. 2. Eluição de fragmentos de DNA a partir do gel de agarose ( <i>Freeze Squeeze</i> ) (Adaptado de Barbas <i>et al</i> , 2001) .....	27
7. Ligaçãõ de fragmentos de DNA.....	28
7. 1. Ligaçãõ de produtos de PCR adenilados no vetor pGEM-T Easy .....	28
7. 2. Ligaçãõ de fragmentos de DNA obtidos por digestãõ .....	29
8. Meios de cultura .....	29
8. 1. Para <i>E. coli</i> (Maranhãõ em Azevedo <i>et al</i> , 2003) .....	29
8. 2. Para <i>P. pastoris</i> (Invitrogen, 2010).....	31
9. Antibióticos.....	32
10. Transformaçãõ bacteriana (Adaptado de Maranhãõ em Azevedo <i>et al</i> , 2003).....	33
10. 1. Transformaçãõ por choque térmico.....	33
10. 2. Transformaçãõ por eletroporaçãõ .....	35
11. Soluções de uso geral .....	36
12. Preparaçãõ de DNA plasmidial (Adaptado de Maranhãõ & Moraes em Azevedo <i>et al</i> , 2003).....	37
12. 1. Preparaçãõ de DNA plasmidial em pequena escala (Miniprep).....	38
12. 2. Preparaçãõ de DNA plasmidial em larga escala (Maxiprep).....	39
13. Sequenciamento .....	41
14. Transformaçãõ de <i>Pichia pastoris</i> (Adaptado de Wu e Letchworth, 2004).....	41
14. 1. Preparaçãõ de células competentes e transformaçãõ por eletroporaçãõ .....	42
15. Detecçãõ de clones produtores por <i>Colony Blot</i> (Adaptado de Invitrogen, 2010) .....	43
16. Expressãõ heteróloga em <i>Pichia pastoris</i> (Adaptado de Invitrogen, 2010) .....	45
16. 1. Etapa de crescimento .....	45
16. 2. Etapa de induçãõ .....	45
17. Imunodetecçãõ dos Fabs por <i>Dot Blot</i> .....	46
18. Concentraçãõ e diálise dos sobrenadantes de cultura de <i>Pichia pastoris</i> .....	46
19. Purificaçãõ por cromatografia de afinidade.....	47
20. SDS-PAGE (Adaptado de Silva-Pereira em Azevedo <i>et al</i> , 2003) .....	49
20. 1. Precipitaçãõ de proteínas por TCA .....	51
20. 2. SDS-PAGE .....	51
21. Imunodetecçãõ dos Fabs por <i>Western Blot</i> (Adaptado de Brígido em Azevedo <i>et al</i> , 2003) .....	52
22. Coloraçãõ de proteínas com prata em gel de poliacrilamida.....	53
23. Concentraçãõ e diálise das frações eluídas na purificaçãõ .....	55

24. Quantificação do Fab em gel de poliacrilamida .....	55
25. Ensaio de ligação direta (ELISA) (Adaptado de Pimentel, 2008) .....	56
<b>ABORDAGEM EXPERIMENTAL .....</b>	<b>58</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
1. Amplificação dos domínios VH e VL por PCR .....	59
2. Clonagem dos domínios VH e VL no vetor pGEM-T Easy VH, CH1, VL E11. ....	60
3. Clonagem do gene do Fab D12 no vetor de expressão de <i>Pichia pastoris</i> . ....	64
4. Sequenciamento do Fab D12 clonado no vetor pPIgLe Fab.....	66
5. Detecção das colônias de <i>Pichia pastoris</i> produtoras do Fab D12 .....	67
6. Expressão do Fab D12.....	68
7. Purificação .....	70
8. Quantificação do Fab .....	72
9. Ensaio de ligação direta .....	73
<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Casos registrados de acidentes ofídicos no Brasil, grandes regiões e estados no período de 2001 a 2011. ....	3
Tabela 2. Iniciadores utilizados ..	23

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procedência das notificações de acidentes ofídicos de acordo com as grandes regiões durante o período de 1990 a 1993.....	2
Figura 2. Proporção dos tipos de acidentes ofídicos registrados em 2008 no Brasil. ....	5
Figura 3. Estrutura esquemática de uma imunoglobulina da classe G (IgG) .....	10
Figura 4. Regiões determinantes de complementariedade (CDRs) .....	11
Figura 5. Fragmentos de anticorpos.....	12
Figura 6. Mapa do vetor pGEM-T Easy.....	20
Figura 7. Mapa do vetor pGEM-T Easy VH, CH1Kex, VL.....	21
Figura 8. Mapa do vetor de expressão pPIgLe Fab .....	22
Figura 9. Cassete clonado no vetor pPIgLe Fab e locais de anelamento de cada um dos iniciadores utilizados no seu sequenciamento. ....	24
Figura 10. Amplificação dos domínios variáveis.....	59
Figura 11. Perfil da digestão do domínio VH E11 com Sac I.....	60
Figura 12. Esquema da clonagem do gene codificador do domínio VH F8 no vetor pGEM-T Easy VH, CH1, VL E11.....	62
Figura 13. Esquema da clonagem do gene codificador do domínio VH D12 no vetor pGEM-T Easy VH, CH1, VL E11.....	63
Figura 14. Esquema da clonagem dos genes codificadores dos domínios VH D12, CH1, VL E11 no vetor pPIgLE Fab.....	65
Figura 15. Sequência proteica do Fab D12.....	66
Figura 16. Alinhamento da porção carboxi-terminal do Fab D12 com a mesma porção do vetor pPIgLe Fab.....	67
Figura 17. Detecção dos transformantes de <i>Pichia pastoris</i> produtores do Fab D12.....	67

Figura 18. Efeito da temperatura de indução na produção do Fab ao longo de 96 horas .....	68
Figura 19. Expressão do Fab D12 pela linhagem GS115 de <i>Pichia pastoris</i> .....	69
Figura 20. Purificação do sobrenadante de cultura concentrado e dialisado contra o tampão de ligação da coluna.....	70
Figura 21. Análise do Fab D12 purificado. ....	71
Figura 22. Quantificação do Fab D12 pelo método de comparação de bandas com BSA .....	72
Figura 23. Ensaio de ligação direta à peçonha de <i>Bothrops atrox</i> . ....	73

## RESUMO

Os acidentes ofídicos, causados principalmente por serpentes do gênero *Bothrops*, são uma importante questão de saúde pública no Brasil. O tratamento de suas vítimas é baseado na administração do soro antiofídico produzido a partir do plasma de cavalos imunizados com peçonha. Por ser composto por anticorpos e outras moléculas, todas de origem equina, a utilização do soro pode gerar diversas respostas imunes adversas contra seus componentes, já que são heterólogos ao paciente. Com o objetivo de desenvolver novos anticorpos humanos para uso clínico, foram isolados Fabs específicos para peçonha de *Bothrops atrox* a partir de uma biblioteca combinatorial de Fabs humanos apresentada na superfície de fagos. Um deles, Fab D12, foi selecionado para expressão. Como sistema de expressão heteróloga do Fab em questão foi utilizada a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* e o gene heterólogo foi posto sob controle do promotor AOX1, que é fortemente ativado na presença de metanol como única fonte de carbono. O melhor nível de produção em frasco, aproximadamente 30 mg/L, foi alcançado fazendo-se o acúmulo de biomassa durante 24 horas a 30 °C em meio contendo glicerol como fonte de carbono e a etapa de indução da síntese do Fab a 20 °C durante 48 horas, com alimentação de metanol a cada 12 horas. A purificação da proteína de interesse foi realizada por cromatografia de afinidade com íons Ni<sup>2+</sup> já que ela carrega em sua porção carboxi-terminal uma cauda de histidina que tem afinidade por esses íons. Por meio de teste de ligação direta à peçonha verificou-se que o Fab D12 puro é capaz de reconhecer o extrato bruto da peçonha.

## ABSTRACT

Snake bites, mainly caused by *Bothrops* snakes, are an important public health issue in Brazil. The treatment of victims is based on the administration of antiophidic serum which is produced from plasma of horses immunized with venom. As it is composed of antibodies and other molecules, all of equine origin, the serum can cause adverse immune responses against various components as they are heterologous to the patient. Aiming the development of new human antibodies for clinical use, it was isolated Fabs specific for the venom of *Bothrops atrox* from a combinatorial library of human Fabs displayed on the surface of phage. One of them, Fab D12, was chosen for expression. As system for heterologous expression of the Fab in question was used the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and the heterologous gene was put under the control of AOX1 promoter, which is strongly activated in the presence of methanol as sole carbon source. The higher level of production in flask, approximately 30 mg/L, was achieved by performing the growth of biomass for 24 hours at 30 ° C in media containing glycerol as sole carbon source and induction of the synthesis of Fab at 20 ° C for 48 hours, with methanol feed at each 12 hours. The purification of the protein of interest was performed by affinity chromatography with Ni<sup>2+</sup> ions as it carries on its carboxy-terminus a histidine tail which has affinity for these ions. Through direct binding assay was confirmed that pure Fab D12 is capable of recognizing the crude extract of *B. atrox* venom.

## LISTA DE TERMOS E ABREVIATURAS

Amp <sup>r</sup>	Gene da $\beta$ -lactamase que confere resistência à ampicilina.
AOX 1	Gene codificador da álcool oxidase 1
BCIP	5-bromo-4-cloro-indolil-fosfato
BMGY	<i>Buffered Glycerol Complex Medium</i>
BMMY	<i>Buffered Methanol Complex Medium</i>
C	Região constante
CDRs	Regiões determinantes de complementariedade
C $\kappa$	Domínio constante tipo kappa da cadeia leve do anticorpo.
CL	Domínio constante da cadeia leve de anticorpo.
cm	Centímetro
CH1	Domínio constante 1 da cadeia pesada de anticorpo
CH2	Domínio constante 2 da cadeia pesada de anticorpo
CH3	Domínio constante 3 da cadeia pesada de anticorpo
CH4	Domínio constante 4 da cadeia pesada de anticorpo
dATP	2'desoxiadenosina trifosfato
dH <sub>2</sub> O	Água destilada
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
Fab	Fragmento de anticorpo de ligação ao antígeno ( <i>antigen binding fragment</i> )
Fc	Fragmento cristalizável (porção constante).
FvFc	Fragmento variável fusionado ao fragmento cristalizável ( <i>variable fragment and crystalizable fragment</i> ).
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
f1 ori	Sequência da origem de replicação de fago.
Hinge	Região de dobradiça de anticorpos
His <sup>-</sup>	Auxotrofia para histidina
<i>HIS 4</i>	Gene Histidinol desidrogenase
IgA	Imunoglobulina da classe A

IgD	Imunoglobulina da classe D
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgM	Imunoglobulina da classe M
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
Kex2	Endopeptidase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
kV	kilovolt
L	Litro
<i>lacZ</i>	Gene da $\beta$ -galactosidase
M	Molar
mA	MiliAmpér
mg	Miligrama
Mg	Magnésio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-(N-morpholino)propanosulfônico
MS	Ministério da Saúde
Mut <sup>+</sup>	<i>Methanol Utilization Positive</i> – Fenótipo de <i>Pichia pastoris</i> que cresce, tendo metanol como fonte de carbono, em níveis semelhantes ao fenótipo selvagem.
$\mu$ F	Microfaraday
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ m	Micrômetro
NBT	<i>Nitro Blue Tetrazole</i>
ng	Nanograma
OD <sub>600</sub>	Densidade óptica em comprimento de onda de 600 nanômetros.
ori	Sequência da origem de replicação bacteriana

pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pGEM-T Easy	Vetor de clonagens
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
pPIgLE Fab	Vetor de expressão do Fab D12 em <i>Pichia Pastoris</i>
PSI	<i>Pound per square inch</i>
p/v	Peso/ Volume
pIII	Proteína III do capsídeo do vírus HIV
q. s. p.	Quantidade suficiente para
rpm	Rotação por minuto
SAB	Soro anti-botrópico
SABC	Soro anti-botrópico-crotálico
SABL	Soro anti-botrópico-laquétrico
SAC	Soro anti-crotálico
SAE	Soro anti-elapídico
scFv	Fragmento variável cadeia única de anticorpo ( <i>Single chain variable fragment</i> ).
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SVMPs	<i>Snake venom metalloproteinases</i>
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TAE	Tampão Tris/Acetato/EDTA
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
U	Quantidade de enzima necessária para digerir 1µg de adenovírus-2 em uma hora em 37 °C no volume total de 50 µL.
V	Região variável
v/v	Volume/Volume
VH	Domínio variável da cadeia pesada de anticorpo
VL	Domínio variável da cadeia leve de anticorpo

x g	Unidade de força centrífuga
X-Gal	5-bromo-4-cloro-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
$\Omega$	Ohm

# INTRODUÇÃO

## 1. Acidentes ofídicos

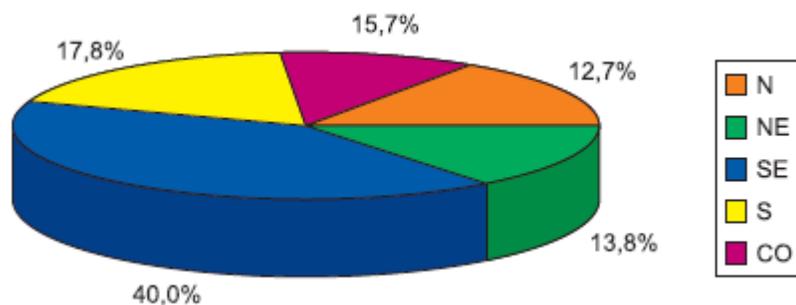
Os acidentes ofídicos, também referidos como ofidismo, são aqueles nos quais uma serpente envenena um animal, que não é sua presa, pela inoculação de toxinas por meio de seu aparelho inoculador. O envenenamento pode produzir alterações locais ou sistêmicas e ocorre quando a serpente é peçonhenta, ou seja, possui aparelho inoculador de peçonha (dentes) capaz de perfurar e injetar a peçonha no corpo do animal. Existem espécies de serpentes que possuem dentes localizados na porção posterior da boca (dentição opistóglifa), ou ainda que não os apresentem (dentição áglifa), dificultando o envenenamento, estas são denominadas serpentes não peçonhentas (FIOCRUZ, 2002). No Brasil, encontram-se serpentes peçonhentas representantes de sete gêneros: *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides*, *Caudisona*, *Lachesis* e *Micrurus*. Os quatro primeiros eram anteriormente agrupados em um único gênero denominado *Bothrops* e o gênero *Caudisona* representa a nova denominação do antigo gênero *Crotalus*. As denominações populares das principais serpentes peçonhentas existentes no Brasil são jararaca, cascavel, surucucu e coral-verdadeira (Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, 2008).

Vital Brazil Mineiro da Campanha foi médico sanitário e o primeiro a estudar e discutir a epidemiologia dos acidentes ofídicos no Brasil. Durante sua graduação e primeiros anos de carreira, presenciou diversas mortes decorrentes de envenenamento por serpentes, o que despertou seu interesse em estudar esses casos (Brazil, 1996). Em 1901 publicou seu primeiro estudo no qual levantou o número de óbitos por mordidas de serpentes peçonhentas no estado de São Paulo. Nesse mesmo ano, na direção do Instituto Butantan, demonstrou a especificidade dos soros monovalentes contra peçonhas de cobras asiáticas, disponíveis à época, e produziu os primeiros soros antiofídicos polivalentes (anti-botrópico e anti-crotálico) (Brazil, 1996). Junto com as ampolas de soro, distribuiu o “Boletim para Observação de *Accidente Ophidico*” que objetivava a notificação desse tipo de acidente, e era preenchido voluntariamente pelos pacientes tratados (Boechner e Struchiner, 2003). Sendo assim, naquela época, os

dados estatísticos e epidemiológicos sobre acidentes ofídicos no Brasil eram muito subestimados e pouco confiáveis, principalmente fora do estado de São Paulo.

Apenas em 1986, foi criado pelo Ministério da Saúde o Programa Nacional de Controle de Acidentes por Animais Peçonhentos cujo propósito é diminuir a letalidade dos envenenamentos, por meio do uso adequado da soroterapia, e reduzir o número de casos realizando a educação em saúde. Com esse programa, todos os casos de acidentes ofídicos atendidos em unidades de saúde, mesmo aqueles que não utilizam a soroterapia, passaram a ser notificados para o conhecimento da abrangência desse agravo (Secretaria de Saúde do estado do Paraná).

Embora relativamente negligenciados, esses acidentes são muito comuns em diversas regiões tropicais e, segundo dados parciais do Ministério da Saúde, em 2011 foram registrados 27.013 casos de acidentes ofídicos no Brasil. Dados anteriores, do período de 1990 a 1993, indicavam aproximadamente 20.000 casos anuais, sendo mais frequentes nas regiões Sudeste e Sul (FUNASA, 2001), como mostra a Figura 1.



**Figura 1. Procedência das notificações de acidentes ofídicos de acordo com as grandes regiões durante o período de 1990 a 1993.** Adaptado de FUNASA, 2001.

Já os dados mais atuais mostram que, entre os anos de 2001 a 2011, eles ocorreram mais frequentemente nas Regiões Norte e Nordeste e com menor frequência nas Regiões Sul e Centro-Oeste, como mostrado na Tabela 1. A diferença observada entre os dados dos períodos citados pode ser explicada pela melhoria na organização dos serviços de saúde e no sistema de informação, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país, indicando que os dados da década de 90 subestimavam os casos nessas regiões devido à dificuldade de acesso à saúde e consequente falta de notificação (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008).

**Tabela 1. Casos registrados de acidentes ofídicos no Brasil, grandes regiões e estados no período de 2001 a 2011.**

Região e UF	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009*	2010**	2011**
<b>Região Norte</b>	<b>4.094</b>	<b>5.542</b>	<b>7.033</b>	<b>7.568</b>	<b>8.646</b>	<b>8.528</b>	<b>8.051</b>	<b>7.859</b>	<b>9.237</b>	<b>9.422</b>	<b>7.951</b>
Rondônia	418	536	756	674	693	600	494	431	471	497	423
Acre	101	173	205	241	324	334	307	403	433	556	409
Amazonas	274	616	944	1.384	1.747	1.717	1.323	1.443	1.690	1.501	1.284
Roraima	30	104	78	179	226	320	293	178	301	217	201
Pará	2.736	3.300	4.116	4.102	4.596	4.526	4.573	4.276	5.088	5.225	4.363
Amapá	9	78	182	242	247	265	339	345	392	326	286
Tocantins	526	735	752	746	813	766	722	783	862	1.100	985
<b>Região Nordeste</b>	<b>4.653</b>	<b>6.368</b>	<b>6.575</b>	<b>6.206</b>	<b>6.755</b>	<b>6.963</b>	<b>6.872</b>	<b>6.788</b>	<b>8.451</b>	<b>8.481</b>	<b>7.263</b>
Maranhão	695	1.046	1.134	1.060	1.359	1.385	1.508	1.454	1.416	1.668	1.538
Piauí	159	175	174	189	236	276	228	173	283	282	219
Ceará	257	647	706	815	804	617	586	680	861	872	618
Rio Grande do Norte	171	237	317	447	356	317	301	255	476	612	348
Paraíba	89	246	275	309	477	541	424	391	618	554	320
Pernambuco	358	587	771	602	679	768	815	721	870	785	856
Alagoas	224	291	293	230	263	257	310	355	387	371	256
Sergipe	26	27	25	57	54	65	182	215	247	196	201
Bahia	2.674	3.112	2.880	2.497	2.527	2.737	2.518	2.544	3.293	3.141	2.907
<b>Região Sudeste</b>	<b>5.970</b>	<b>6.779</b>	<b>7.534</b>	<b>8.238</b>	<b>7.546</b>	<b>7.716</b>	<b>6.683</b>	<b>6.788</b>	<b>6.382</b>	<b>6.581</b>	<b>6.490</b>
Minas Gerais	2.987	3.554	4.004	4.449	3.976	4.169	3.545	3.488	2.938	3.262	3.462
Espírito Santo	897	1.050	892	1.238	1.083	1.035	1.092	1.140	908	867	932
Rio de Janeiro	406	370	532	545	576	656	581	434	628	594	443
São Paulo	1.680	1.805	2.106	2.006	1.911	1.856	1.465	1.726	1.908	1.858	1.653
<b>Região Sul</b>	<b>2.173</b>	<b>2.639</b>	<b>2.826</b>	<b>2.765</b>	<b>2.682</b>	<b>2.882</b>	<b>3.064</b>	<b>2.748</b>	<b>2.969</b>	<b>2.778</b>	<b>2.374</b>
Paraná	819	904	866	838	944	943	1.088	998	1.012	940	831
Santa Catarina	712	752	886	835	828	853	889	818	902	812	657
Rio Grande do Sul	642	983	1.074	1.092	910	1.086	1.087	932	1.055	1.026	886
<b>Região Centro-Oeste</b>	<b>1.783</b>	<b>2.286</b>	<b>2.721</b>	<b>2.696</b>	<b>2.881</b>	<b>2.717</b>	<b>2.360</b>	<b>2.743</b>	<b>3.015</b>	<b>3.236</b>	<b>2.935</b>
Mato Grosso do Sul	259	295	395	504	482	455	326	537	583	486	494
Mato Grosso	485	771	946	1.069	1.186	1.175	1.149	1.131	1.313	1.431	1.124
Goias	920	1.133	1.275	1.045	1.145	1.023	742	926	1.008	1.173	1.140
Distrito Federal	119	87	105	78	68	64	143	149	111	146	177
<b>Brasil</b>	<b>18.673</b>	<b>23.614</b>	<b>26.690</b>	<b>27.473</b>	<b>28.510</b>	<b>28.806</b>	<b>27.030</b>	<b>26.926</b>	<b>30.054</b>	<b>30.498</b>	<b>27.013</b>

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net acessado em 15/02/2012.

\* Dados sujeitos à revisão

\*\* Dados parciais

O aumento do número de casos anuais, em relação aos registrados na década de 90, mostrados na Tabela 1 se deve, em grande parte, à expansão das áreas cultivadas por agropecuaristas que invadem as matas habitadas por serpentes, aumentando a frequência de encontros entre homens e serpentes. Segundo dados do Ministério da Saúde, a maior parte dos acidentes ofídicos ocorre com lavradores do sexo masculino entre 15 e 40 anos durante seu trabalho no campo, principalmente devido a não utilização de equipamentos individuais de proteção como botas e luvas.

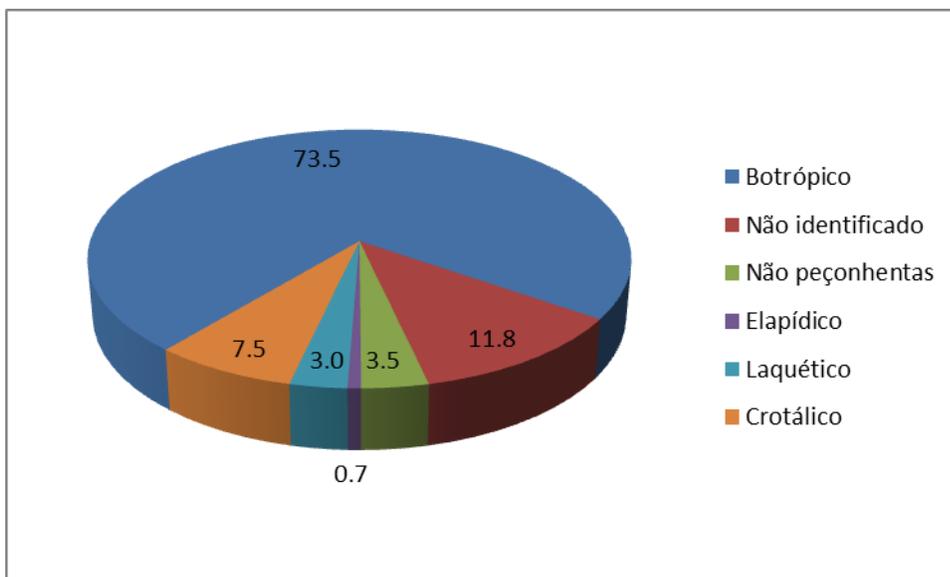
Cerca de 71% das picadas ocorrem nas pernas ou pés, 14% nas mãos ou antebraços e 15% em outras partes do corpo (FUNASA, 2001).

### 1. 1. Acidentes botrópicos

Os gêneros *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias* e *Bothropoides* representam o grupo mais importante de serpentes peçonhentas de interesse médico no Brasil, com mais de 60 espécies encontradas em todo o território nacional. A espécie *Bothrops atrox*, conhecida popularmente como jararaca-do-norte, é a mais abundante na região Amazônica, sendo facilmente encontrada nas proximidades de rios, e é também a maior causadora de acidentes ofídicos no Brasil (Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, 2008). Essa espécie ocorre na região norte da América do Sul, se estendendo desde a Guiana até a Bolívia, compreendendo grande parte da Amazônia (Wüster *et al*, 1996).

É uma serpente de hábito terrícola, mas geralmente encontrada próxima a cursos de água. Os juvenis dessa espécie são frequentemente avistados sobre árvores ou arbustos. *B. atrox* é uma serpente predominantemente noturna, ou seja, forrageia durante a noite e permanece inativa a maior parte do dia, com exceção dos momentos em que busca o sol para se aquecer (Oliveira e Martins, 2001).

Dados divulgados em 2008 pelo Ministério da Saúde mostram que 73,5% dos acidentes ofídicos registrados no país são do tipo botrópico, enquanto 11,2% correspondem àqueles ocorridos pelos outros três gêneros de serpentes peçonhentas. Em 11,8% dos acidentes não foi possível identificar o gênero da serpente e apenas 3,5% dos casos ocorreram por serpentes não peçonhentas. Esses dados estão detalhadamente mostrados na Figura 2. A maior parte dos acidentes acontece durante o período quente e chuvoso do ano no qual as serpentes são mais ativas (Oliveira e Martins, 2001).



**Figura 2. Proporção dos tipos de acidentes ofídicos registrados em 2008 no Brasil.** Fonte: Sinan Net acessado em 15/02/12.

O quadro clínico decorrente do envenenamento botrópico se inicia com as manifestações locais, ainda nas primeiras horas após o acidente, e incluem dor, edema e equimoses na região da mordida, que podem evoluir para bolhas de conteúdo sero-hemorrágico culminando, quando não administrada a soroterapia em tempo hábil, com a necrose dos tecidos e até amputação do membro. Também podem ocorrer manifestações sistêmicas como gengivorragia, hematúria e hemorragias em cavidades corporais levando a consequente hipotensão e hipovolemia, podendo levar a casos de insuficiência renal aguda (FUNASA, 2001).

Apesar de ser relativamente baixa – 0,4% – a taxa de mortalidade nos casos de acidentes botrópicos pode ser aumentada em até oito vezes quando o tratamento não é realizado dentro das seis primeiras horas após o acidente. Por outro lado, a frequência de sequelas decorrentes de complicações locais é bem mais alta – cerca de 10% – sendo a rapidez no início do tratamento fundamental para evitá-las (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2008).

### 1.1.1. Peçonha de *Bothrops atrox*

Os acidentes ocorridos por *B. atrox* são os mais importantes na região Amazônica considerando-se o número de casos e a taxa de mortalidade (Pardal et al, 1995; Sá Neto e Santos, 1995). A peçonha dessa espécie apresenta uma grande atividade proteolítica. Enzimas como metaloproteinases, serinoproteinases e fosfolipases, responsáveis pelos quadros de hemorragias locais e sistêmicas e necrose tecidual diagnosticados em vítimas desses animais, são seus componentes mais abundantes.

O desequilíbrio da homeostasia sanguínea decorre principalmente da atividade de metaloproteinases de peçonha de serpente (*snake venom metalloproteinases – SVMPS*) que desestabilizam a membrana basal dos capilares causando sua ruptura (Baldo et al, 2010). O efeito miotóxico é reflexo da atividade degenerativa das fosfolipases sobre as membranas celulares causando desorganização das miofibrilas e necrose do músculo esquelético (Zamunér et al, 2004).

Apesar do conhecimento de que algumas moléculas estão sempre presentes na peçonha da espécie *B. atrox*, sua composição apresenta uma grande variabilidade individual, inclusive durante o desenvolvimento da serpente, portanto para a formulação de um antipeçonha altamente eficiente é necessária a utilização de amostras de peçonhas de indivíduos em vários estágios de maturação diferentes (Assakura et al, 1992).

## 2. A Soroterapia

Em 1894, Léon Charles Albert Calmette – médico, bacteriologista e imunologista francês – desenvolveu o primeiro antipeçonha para tratar casos de mordedura de serpentes, utilizando soro de cavalos imunizados. O método desenvolvido por ele baseou o utilizado por Vital Brazil. Desde o início dos trabalhos do médico brasileiro na pesquisa de tratamentos para acidentes ofídicos brasileiros, a terapia utilizada em casos de envenenamento continua sendo a administração endovenosa de soro

antiofídico, pois ela se mantém como o único tratamento comprovadamente eficaz (Cardoso *et al*, 1993).

O Instituto Butantan, em São Paulo, o Instituto Vital Brazil, no Rio de Janeiro, e a Fundação Ezequiel Dias, em Minas Gerais, são os principais produtores dos soros antipeçonha no Brasil. Eles repassam toda sua produção ao Ministério da Saúde, que então controla a distribuição e utilização desse tratamento na rede pública de saúde.

São cinco os tipos de soros antiofídicos produzidos por essas instituições, os específicos antibotrópico (SAB), anticrotálico (SAC), antielapídico (SAE) e os mistos antibotrópico-laquétrico (SABL) e antibotrópico-crotálico (SABC) (Instituto Butantan). Esses soros são produzidos da seguinte maneira: uma pequena e inócua dose da peçonha é injetada em um cavalo que então irá produzir anticorpos contra a peçonha; doses adicionais e crescentes da peçonha voltam a ser injetadas no cavalo para permitir que a produção de anticorpos alcance nível suficiente; então é realizada uma sangria, na qual até 16 litros de sangue podem ser retirados do animal; o sangue é centrifugado, a fração celular é reintroduzida no cavalo para não prejudicar sua saúde e o plasma, contendo os anticorpos, é purificado para ser utilizado como soro antiofídico (Museu de Ciências Naturais/UCS). O soro antiofídico produzido pelo Centro de Produção e Pesquisas de Imunobiológicos (CPPI), vinculado à Secretaria de Saúde do Paraná, é comercializado na forma de  $F(ab')_2$  (CPPI, 2008).

Com exceção do SAC, que é específico para a única espécie do gênero *Caudisona* encontrada no Brasil: a *Caudisona durissus*, todos os outros soros brasileiros são produzidos a partir de uma mistura (*pool*) de peçonhas de algumas espécies do mesmo gênero. Por exemplo, o SAB é obtido a partir da seguinte mistura de peçonhas: 50% *Bothrops jararaca*, 12,5% *B. moojeni*, 12,5% *B.jararacussu*, 12,5% *B. alternatus* e 12,5% *B. neuwiedi* (BVS/MS, 1996). Sendo assim, e sabendo-se que a composição da peçonha varia de espécie para espécie (Assakura *et al*, 1992) mesmo pertencentes ao mesmo gênero, a ação neutralizante dos soros comerciais varia de acordo com a espécie que causou o acidente podendo, inclusive, não apresentar nenhum tipo de neutralização (Zamunér *et al*, 2004). Em 1992, Dos-Santos e colaboradores corroboraram as observações feitas por Vital Brazil no início do século XX, demonstrando que a peçonha de *Bothrops jararacussu*, que é um dos presentes no

*pool* de peçonhas utilizado na produção do soro antiofídico (CPPI, 2008), é mais bem neutralizado pelo soro antiofídico-crotálico do que pelo soro específico para seu gênero.

Além desse, outros trabalhos demonstram que a atividade miotóxica da peçonha de espécies do gênero *Bothrops* não é bem neutralizada com a soroterapia convencional (Cardoso *et al*, 1993; Zamuner, *et al* 2004). Dentre eles destaca-se o trabalho de Pardal e colaboradores (2004) que testou a eficiência de neutralização da peçonha de *B. atrox*, que não está entre as peçonhas utilizadas durante a imunização dos equinos para a produção do antiofídico, pelo soro antiofídico comercial e demonstrou que é de 56%. A soroterapia, apesar de na maioria dos casos neutralizar os efeitos sistêmicos da peçonha satisfatoriamente, não é eficaz em neutralizar os prejuízos teciduais locais, o que representa uma séria deficiência dessa terapia (Fry *et al*, 2003).

O tratamento convencional se utiliza de soros compostos por uma mistura de anticorpos e outras moléculas, tudo de origem equina. Desse fato advém o maior dos problemas decorrentes da utilização desse tipo de terapia: o reconhecimento dessas moléculas heterólogas ao paciente e as consequentes respostas do sistema imunológico contra elas. As reações adversas precoces ocorrem com uma frequência bastante variável – de 4,6% a 87,2%. Podem ser leves como urticária, náuseas, dor abdominal, tremores, tosse, prurido e rubor facial; mas também podem ser graves como o choque anafilático. As reações tardias, também conhecidas como doença do soro, incluem artralgia, febre, linfadenomegalia, proteinúria e urticária, mas a frequência com que ocorrem é subestimada já que muitos pacientes não retornam ao médico quando os sintomas aparecem (FUNASA/MS, 2001).

### **3. A busca por novos tratamentos**

Devido aos problemas apresentados pela soroterapia convencional, muitos esforços foram voltados para o desenvolvimento de novos tratamentos que pudessem substituir ou complementar o já existente, visando uma maior eficácia na solução dos efeitos do envenenamento. Muitos trabalhos relatam a eficiência de inibidores naturais

de componentes clinicamente importantes da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* como: a heparina que possui capacidade de neutralizar os efeitos neurotóxicos (Rostelato-Ferreira *et al*, 2010) e inibir a atividade miotóxica da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Melo *et al*, 1993); fucoidan que também previne a atividade miotóxica da PLA<sub>2</sub> (Lomonte e Angulo, 2003); além de extratos brutos de várias plantas que se mostraram eficientes na neutralização de efeitos locais (Lucena *et al*, 2008) e sistêmicos (Vale, 2007) do envenenamento.

Outra vertente de pesquisas com o mesmo objetivo é a produção heteróloga de anticorpos humanos capazes de neutralizar os efeitos tóxicos do peçonha. Essa metodologia utiliza como sistemas de expressão microrganismos (bactérias e leveduras), fungos filamentosos e cultura de células de mamíferos para a produção de proteínas humanas cujos genes foram inseridos no genoma dessas células. Dessa forma é possível obter grandes quantidades dos anticorpos de interesse, purificá-los e então utilizá-los no tratamento de envenenamentos. A principal vantagem dessa nova terapia é a drástica redução dos efeitos colaterais decorrentes da resposta imunológica aos antígenos equinos presente no soro antiofídico, por se tratar de uma proteína humana.

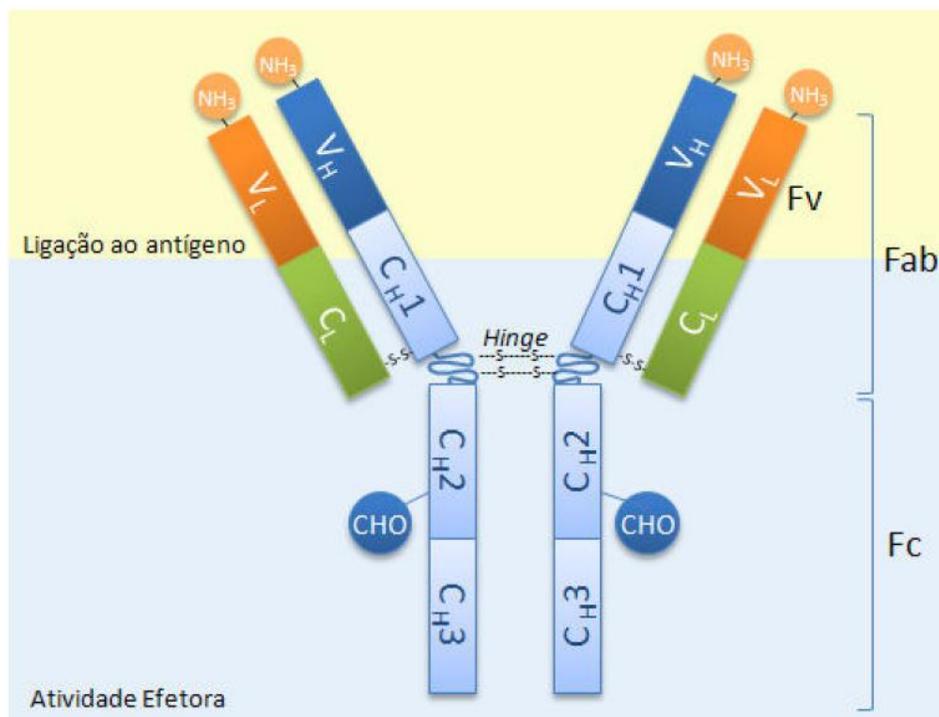
#### 4. Imunoglobulinas

Os anticorpos, ou imunoglobulinas, são glicoproteínas sintetizadas e excretadas por células plasmáticas derivadas dos linfócitos B, atuando na resposta imune humoral dos vertebrados. A molécula de imunoglobulina é de natureza tetramérica e apresenta um eixo de simetria dupla, sendo composta por duas cadeias pesadas (*heavy chain* – H) idênticas e duas cadeias leves (*light chain* – L) também idênticas. Ambas as cadeias possuem regiões variáveis (*variable* – V) e regiões constantes (*constant* – C). Cada anticorpo reconhece especificamente uma determinada sequência de aminoácidos com estrutura tridimensional definida e é produzido por uma única célula plasmática ou seus clones (Abbas, 2008).

A molécula de anticorpo apresenta estrutura semelhante a uma letra Y e possui duas funções distintas: ligar-se especificamente aos antígenos reconhecidos pelo

sistema imune e recrutar outros mecanismos desse sistema para destruir o antígeno. A primeira é fundamental para os mecanismos de neutralização de toxinas enquanto a segunda tem pouca importância para eles. O recrutamento do sistema efetor é, entretanto, essencial aos mecanismos de defesa que envolvem eliminação de patógenos e de células tumorais.

Cada uma dessas funções é exercida por porções diferentes da molécula, sendo os braços do Y (Fabs), que incluem as regiões variáveis leves e pesadas, responsáveis pela atividade de ligação ao antígeno; e a base do Y (Fc), composta pela região mais conservada da cadeia pesada, responsável pela interação com outras moléculas e células. Sendo assim, as imunoglobulinas são moléculas bifuncionais que possuem dois sítios de ligação ao antígeno e um sítio efetor (Janeway *et al*, 2008) (Figura 3).

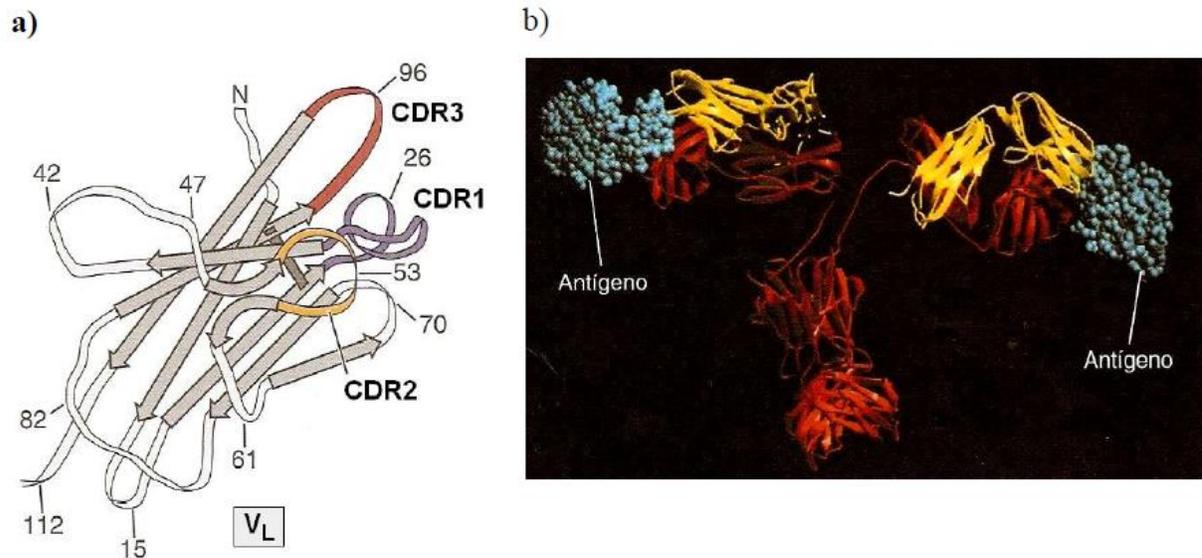


**Figura 3. Estrutura esquemática de uma imunoglobulina da classe G (IgG).** Extraído de Simi, 2009.

A cadeia leve é composta por um domínio variável (VL) e um domínio constante (CL) que pode ser do tipo  $\kappa$  ou  $\lambda$ . Já a cadeia pesada é formada por um domínio variável (VH) e três ou quatro domínios constantes (CH1, CH2, CH3 e CH4). Os domínios constantes da cadeia pesada podem se agrupar em cinco padrões distintos

denominados  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  ou  $\mu$ . Esse padrão determina a classe a qual a imunoglobulina pertence, sendo denominada IgA, IgD, IgG, IgE ou IgM, respectivamente (Janeway *et al*, 2008).

Os domínios variáveis, leves e pesados, são assim denominados devido a grande variabilidade na sequência de aminoácidos que os formam. Porém dentro desses domínios existem regiões cuja sequência de aminoácidos é razoavelmente conservada, as regiões de arcabouço (*framework*), e também regiões de sequências hipervariáveis, denominadas regiões determinantes de complementariedade (CDRs) (Goldsby, 2002). As CDRs das cadeias pesadas e leves, em conjunto, formam o sítio de ligação ao antígeno, o paratopo. Mais especificamente, as CDRs se apresentam na forma de loops projetados para fora da estrutura da imunoglobulina que interagem diretamente com o antígeno durante a ligação. Cada domínio variável, leve ou pesado, possui três CDRs e o conjunto delas é estruturalmente complementar à região de contato no antígeno, o epítipo (Figura 4) (Abbas, 2008).

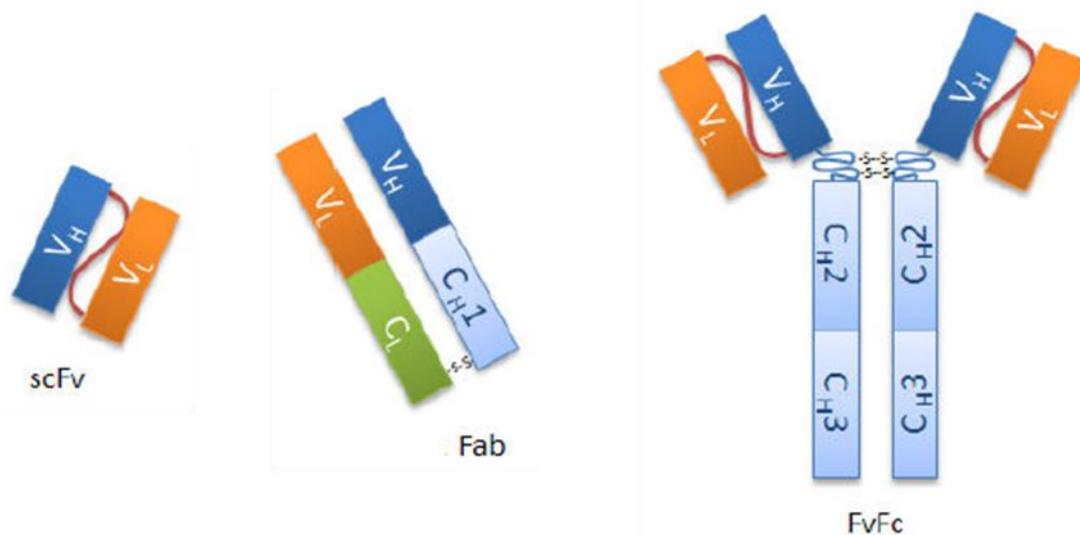


**Figura 4. Regiões determinantes de complementariedade (CDRs).** a) Esquema tridimensional das CDRs do domínio variável leve (VL). A CDR1 está mostrada em azul, a CDR2 em amarelo e a CDR3 em vermelho. As regiões de arcabouço estão representadas em cinza. b) Modelo cristalográfico da interação antígeno-anticorpo. Em azul estão representados os antígenos, em amarelo as cadeias leves e em vermelho as cadeias pesadas. Adaptado de Abbas, 2008.

Cada anticorpo possui uma única especificidade antigênica. Isso significa que para reconhecer e eliminar todos os antígenos com os quais um organismo pode entrar

em contato durante sua vida, o sistema imunológico deve ser capaz de produzir uma enorme diversidade de anticorpos. Essa variabilidade é obtida, principalmente, por meio do mecanismo de rearranjo dos segmentos gênicos que ocorre nos loci dos genes codificadores dos domínios variáveis de cada cadeia. Cada tipo de segmento gênico (V e J para a cadeia leve; e V, D e J para a cadeia pesada) está presente em múltiplas cópias no genoma da linhagem germinal dos linfócitos B. A seleção de um segmento gênico de cada tipo durante o rearranjo gênico ocorre ao acaso, e o grande número de combinações possíveis explica a imensa diversidade de imunoglobulinas, aproximadamente  $10^6$  combinações. Além desse, outros eventos acontecem durante a determinação da especificidade dos anticorpos, aumentando ainda mais o repertório de anticorpos de um indivíduo, consistindo, no homem, em ao menos  $10^{11}$  moléculas distintas (Abbas, 2008).

A partir da molécula de imunoglobulina podem ser obtidos, por meio de digestão enzimática ou por engenharia de anticorpos, diversos fragmentos que podem manter a atividade efetora e/ou a atividade de ligação ao antígeno das imunoglobulinas. Os fragmentos que mantêm a atividade de reconhecimento e ligação ao antígeno são aqueles que possuem os domínios variáveis como o scFv (*single chain variable fragment*), o Fab (*antigen binding fragment*), o FvFc (*variable fragment and fragment crystallizable*) sendo que o último mantém também a atividade efetora (Figura 5).



**Figura 5. Fragmentos de anticorpos.** O scFv e o Fab não são capazes de recrutar sistemas efetores para eliminação do antígeno, apenas os neutralizam mantendo-se ligados a eles. O FvFc, além das

atividade de ligação ao antígeno, preserva também a atividade efetora das imunoglobulinas. Adaptado de Simi, 2009.

## 5. Seleção de anticorpos de interesse

Devido à sua alta afinidade e especificidade de ligação, os anticorpos são moléculas de grande interesse biotecnológico e biomédico (Maynard e Georgiou, 2000). Com os grandes avanços na área da engenharia genética, as imunoglobulinas são cada vez mais requeridas para pesquisa científica e também como ferramentas para diferentes objetivos como, por exemplo, a terapia ou o diagnóstico de várias doenças.

Uma técnica muito utilizada durante a seleção de anticorpos de interesse, etapa anterior à produção heteróloga de anticorpos humanos, é o *Phage Display*, onde os anticorpos são apresentados na superfície de bacteriófagos. A grande vantagem do *Phage Display* é a capacidade de apresentação de um imenso repertório combinatório de anticorpos, podendo atingir  $10^8$  possibilidades. A metodologia se baseia na inserção de genes humanos no genoma do fago em tandem ao gene de proteínas do capsídeo viral, como pIII, e resulta na produção de uma proteína fusionada ao anticorpo, que então ficará exposto na superfície da partícula viral. Dessa forma a imunoglobulina fica acessível ao reconhecimento de um ligante, possibilitando a seleção de anticorpos por meio de um antígeno de interesse (Brígido e Maranhão, 2002).

## 6. Expressão heteróloga de anticorpos e seus fragmentos

O desenvolvimento da Tecnologia do DNA recombinante e de clonagem gênica forneceu aos pesquisadores métodos pelos quais os genes, ou outros segmentos cromossômicos, podem ser isolados, alterados, replicados e estudados (Snustad e Simmons, 2008). Desde a década de 80, quando protocolos de clonagem e expressão de anticorpos em bactérias foram estabelecidos, por meio dessas e outras técnicas a engenharia de anticorpos vem se desenvolvendo (Maynard e Georgiou, 2000). A possibilidade de utilização de anticorpos inteiros ou seus fragmentos em terapias, diagnósticos ou como ferramentas moleculares biotecnológicas tem propulsionado a busca por métodos alternativos de produção de proteínas em larga escala.

Para expressão heteróloga de proteínas em escalas industriais é interessante utilizar sistemas de expressão que possibilitem uma alta taxa de expressão e que sejam facilmente cultiváveis. Para esse fim, foi desenvolvida uma série de linhagens de microorganismos que permitem a produção de altos níveis da proteína recombinante. A bactéria *Escherichia coli* foi o sistema de expressão mais utilizado para produção de anticorpos e seus fragmentos, porém em muitos casos os pesquisadores se deparavam com problemas como baixa produção, formação de agregados contendo a proteína heteróloga e dificuldade de purificação. Damasceno e colaboradores (2004) demonstraram que fragmento de anticorpo ficava retido no periplasma bacteriano e prejudicava a taxa de produção final. Outra desvantagem do sistema bacteriano é a limitação do tipo de proteína a ser expressa pois, por ser um procaríoto, não possui aparato para realizar modificações pós-traducionais, que em alguns casos é fundamental para a atividade proteica.

Sendo assim, as leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, ganharam destaque no papel de sistemas de expressão apresentando diversas vantagens frente ao sistema bacteriano. Por serem células eucarióticas, as leveduras são capazes de realizar modificações pós-traducionais como processamento proteolítico, glicosilação, entre outras e, apesar disso, são tão facilmente cultiváveis quanto as bactérias. A secreção das proteínas heterólogas é feita com maior eficiência nesses sistemas e as taxas de produção final também são semelhantes às bacterianas (Cregg *et al*, 2000).

## **7. *Pichia pastoris* como sistema de expressão heteróloga**

*Pichia pastoris* é uma levedura metilotrófica, ou seja, é capaz de utilizar o metanol como única fonte de carbono. Essa capacidade é devida aos genes AOX que codificam as enzimas álcool oxidase 1 e 2 responsáveis pela conversão do metanol em formaldeído e peróxido de hidrogênio, primeira etapa do metabolismo do metanol (Ledebouer *et al*, 1985). Desse fato advêm duas vantagens da utilização dessa levedura como sistema de expressão heteróloga: o baixo custo do metanol faz com que essas culturas não sejam muito dispendiosas e a possibilidade de se realizar a expressão da

proteína de interesse em momento controlado, utilizando-se o promotor do gene *AOX 1*, que além de ser ativado apenas na presença de metanol e inibido em glicose ou glicerol é um promotor forte, ou seja, os genes sob seu controle são altamente expressos (Cregg *et al*, 2000).

Essa levedura realiza glicosilações proteicas mais semelhantes à de humanos do que *S. cerevisiae* realiza, já que a última tende à hiperglicosilação. Além disso, as culturas de *P. pastoris* podem atingir altas densidades celulares sem afetar a viabilidade das células, podendo atingir 100g/L de peso seco (Cregg e Higgins, 1995). Finalmente, a levedura libera, comparativamente, poucas proteínas endógenas para o meio extracelular ao mesmo passo que secreta grandes quantidades da proteína heteróloga, sendo essa a maior vantagem para subsequente purificação da proteína de interesse (Laroche *et al*, 1994).

Trabalhos relatam sucesso na expressão de fragmentos de anticorpos em *P. pastoris*. Freyre e colaboradores (2000) demonstraram a produção de 1,2 g/L de um scFv anti-antígeno carcinoembriônico; Lange e colaboradores (2001) atingiram um nível de 40 mg de um Fab puro por litro de cultura, taxa semelhante à obtida por Takahashi e colaboradores (2000) para outro Fab.

## 8. O presente trabalho

Em trabalho anterior do Grupo de Imunologia Molecular da UnB foi construída uma biblioteca combinatória de Fabs apresentada na superfície de fagos a partir do repertório imune de 11 pessoas (Dantas-Barbosa *et al*, 2005). Os Fabs são fragmentos de anticorpos compostos por uma cadeia pesada, contendo os domínios VH e CH1, e uma cadeia leve, contendo os domínios VL e Cκ, cada uma delas correspondendo a uma proteína de aproximadamente 26 kDa. Em outro trabalho do mesmo grupo, essa biblioteca foi utilizada para isolar Fabs que reconhecessem o extrato bruto do peçonha de *Bothrops atrox* (Mendes, 2006). Nesse trabalho foram selecionados quatro clones, baseados na alta afinidade de ligação ao peçonha, e prosseguiu-se a expressão em *E. coli*, porém a eficiência de produção foi baixa e não permitiu a caracterização dessas moléculas.

Tendo em vista tudo que foi explicitado anteriormente, o presente trabalho busca expressar e caracterizar três dos Fabs selecionados no trabalho de Mendes (D12, E11 e F8) utilizando-se do sistema de expressão *Pichia pastoris*.

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Expressão e caracterização de três Fabs (D12, E11 e F8) anti-peçonha de *Bothrops atrox* em *Pichia pastoris*.

### Objetivos específicos

- 1) Clonagem dos fragmentos VH e VL dos três Fabs no vetor de expressão de *Pichia pastoris* pPIgLE Fab;
- 2) Expressão heteróloga dos Fabs em *Pichia pastoris*;
- 3) Purificação dos Fabs;
- 4) Ensaio de ligação ao peçonha de *Bothrops atrox*;

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Linhagens celulares

#### 1. 1. *Escherichia coli*

Durante as etapas de clonagem, foram utilizadas as linhagens bacterianas descritas abaixo devido à facilidade de manipulação genética e rápido cultivo. Os genes listados representam alelos mutantes.

##### - XL1-Blue (Stratagene)

Genótipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn 10* (Tet<sup>r</sup>)].

Fenótipo: endonuclease deficiente, recombinase deficiente, permite a seleção de colônias azuis e brancas, resistente à tetraciclina.

##### - XL10GOLD (Stratagene)

Genótipo: Tet<sup>r</sup>Δ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn 10* (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>].

Fenótipo: sistemas de restrição deficiente, endonuclease deficiente, recombinase deficiente, permite a seleção de colônias azuis e brancas, resistente à tetraciclina, resistente ao cloranfenicol. Essa linhagem foi desenvolvida para a eficiente transformação (Hte) utilizando moléculas grandes de DNA.

#### 1. 2. *Pichia pastoris*

Para a integração do plasmídeo contendo o gene de interesse no *locus HIS4* genômico da levedura e posterior expressão da proteína heteróloga foi utilizada a seguinte linhagem da levedura *P. pastoris*:

### - GS115 (Invitrogen)

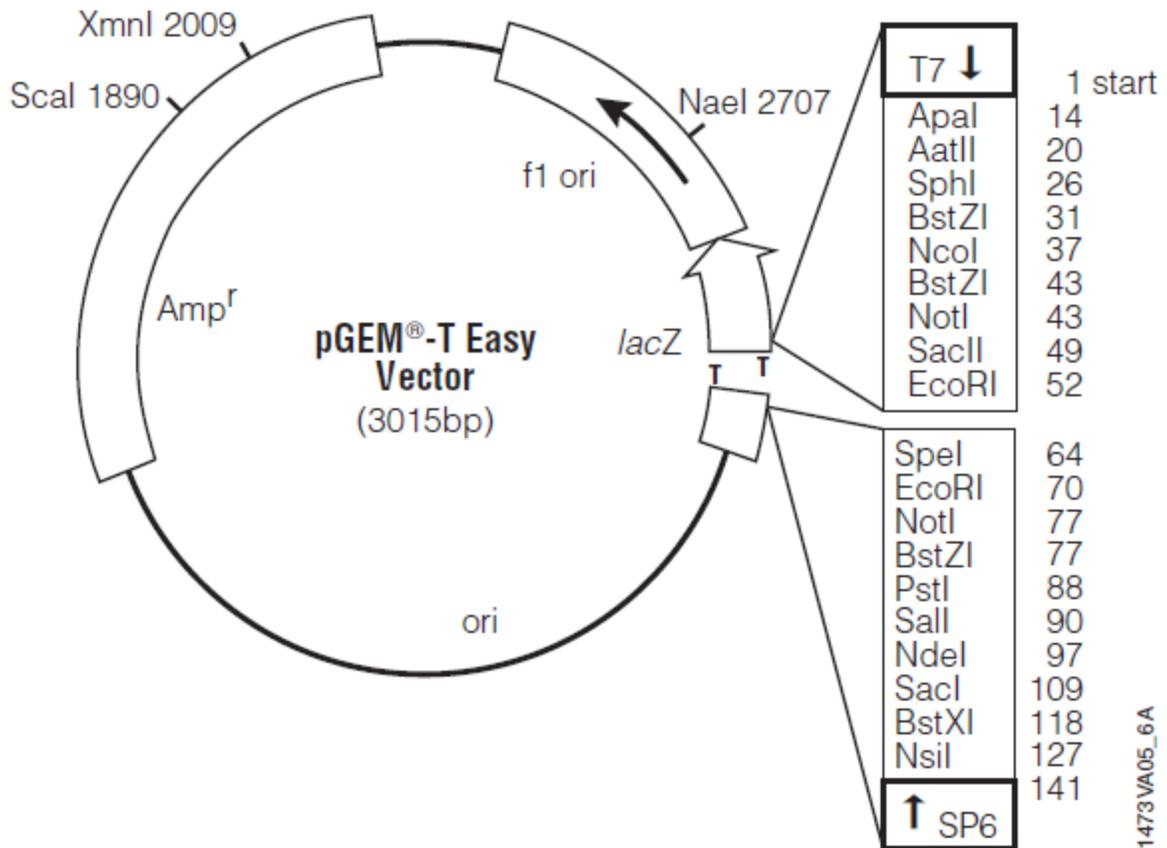
Genótipo: *his4*.

Fenótipo: Mut<sup>+</sup> (crescimento rápido em metanol como única fonte de carbono devido à atividade da enzima *aox1*), His<sup>-</sup> (auxotrófica para histidina).

## 2. Plasmídeos

### 2. 1. pGEM-T Easy (Promega)

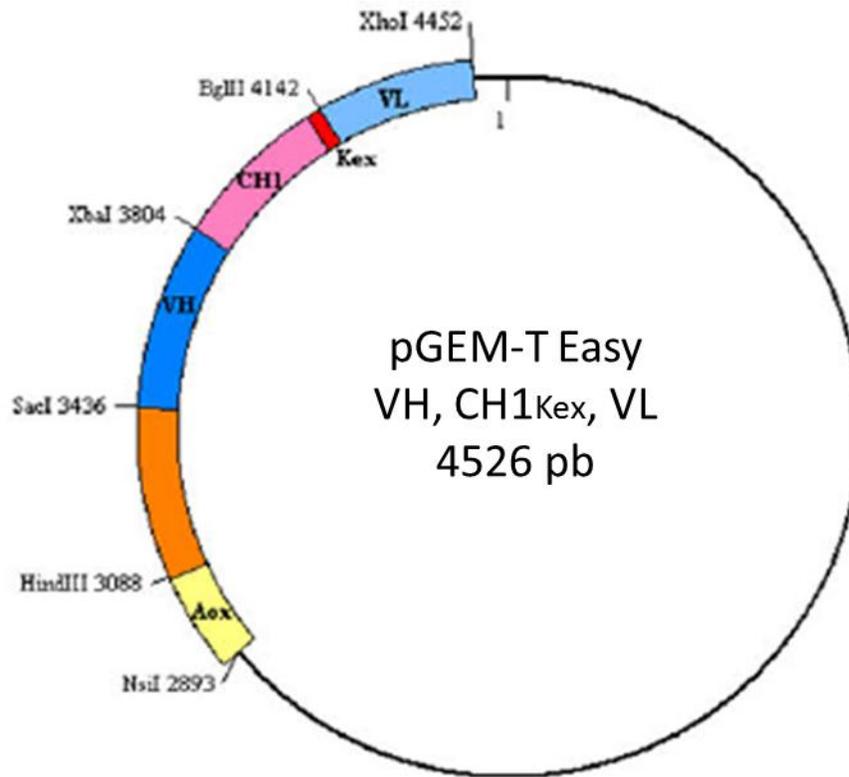
Vetor linearizado comercial utilizado para a ligação de fragmentos de PCR adenilados. Esse vetor possui, em suas extremidades, uma timina não pareada que facilita a ligação de produtos de PCR que apresentam, em suas extremidades 3'e 5', adeninas não pareadas geradas pela ação de alguns tipos de DNA polimerases que tem atividade adenosina terminal transferase. É um vetor presente no citoplasma celular em alto número de cópias que possui uma região de clonagem, com múltiplos sítios de enzimas de restrição, flanqueada pelas sequências promotoras das RNA polimerases virais SP6 e T7. Essa região de clonagem se encontra dentro da sequência codante da enzima  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*), o que permite a seleção de clones transformados com o plasmídeo contendo o inserto de PCR pela análise da cor, azuis ou brancos. Possui também o gene de resistência à ampicilina (*Amp<sup>r</sup>*) e as sequências da origem de replicação plasmidial (*ori*) e da origem de replicação de fago (*f1 ori*). A Figura 6 mostra o mapa esquemático desse vetor (Promega, 2010).



**Figura 6. Mapa do vetor pGEM-T Easy.** Nos quadros à direita estão mostrados a posição dos sítios reconhecidos por várias enzimas de restrição flanqueados pelas sequências SP6 e T7. Extraído de Promega, 2010.

## 2. 2. pGEM-T Easy Fab (Simi, 2009)

Vetor construído por Simi, a partir da clonagem de genes codificadores dos domínios VH, CH1 e VL de imunoglobulinas, da região de peptídeo sinal do fator  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae* e da sequência promotora do gene da enzima álcool oxidase 1 (AOX1) de *Pichia pastoris*, no vetor comercial pGEM-T Easy descrito acima. Foi inserido também a sequência reconhecida pela endopeptidase Kex2 entre as sequências do CH1 e do VL para permitir que, após a tradução dos domínios clonados como cadeia única de proteína, os domínios leves e pesados pudessem ser separados para a correta montagem do Fab (Burtet, 2007).

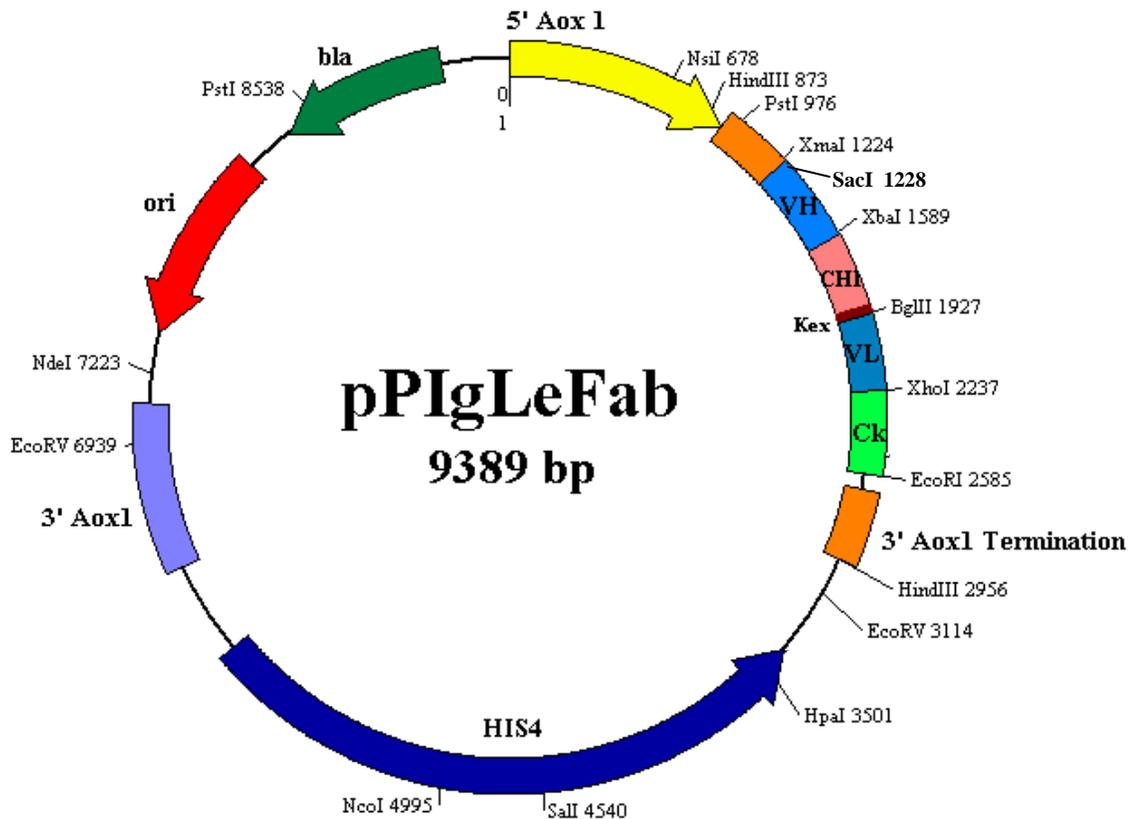


**Figura 7. Mapa do vetor pGEM-T Easy VH, CH1<sub>Kex</sub>, VL.** Em azul claro está representado o gene codificador do domínio variável leve, em vermelho a sequência reconhecida pela endopeptidase Kex2, em rosa a sequência do primeiro domínio constante pesado, em azul escuro a do domínio variável pesado de imunoglobulinas. Em laranja está mostrada a região codificadora do peptídeo sinal do fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae* e em amarelo a região promotora do gene AOX1. Na figura não estão mostrados o gene que confere resistência à ampicilina (Ampr), o gene lacZ interrompido pela clonagem dos fragmentos e as origens de replicação viral (f1 ori) e bacteriana (ori), porém esse vetor possui todas essas sequências.

### 2. 3. pPIgLe Fab (Burtet, 2007)

Vetor de expressão em *Pichia pastoris* que contém sequências de um fragmento Fab, do sinal de secreção do fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, da região promotora e terminadora do gene AOX1, do gene de resistência à ampicilina, da origem de replicação bacteriana e do gene HIS4 para permitir a integração por recombinação homóloga no genoma da levedura. Esse vetor codifica para expressão monocistrônica do Fab, cujas cadeias leve e pesada são, em uma modificação pós-traducional, separados proteoliticamente, devido ao reconhecimento de um sítio inserido entre o CH1 e o VL, pela endopeptidase Kex2 que cliva a proteína liberando as cadeias para a montagem do Fab (Burtet, 2007). Além disso, na extremidade 3' do domínio C<sub>k</sub>, foi

inserido a cauda 6xHIS, que forma um anel e interage com alta afinidade com ions  $Ni^{2+}$ , para permitir a posterior purificação dos Fabs. A Figura 8 mostra o mapa desse vetor.



**Figura 8. Mapa do vetor de expressão pPIgLe Fab.** As seqüências codificadoras do Fab e demais seqüências importantes estão identificadas na figura. Os sítios de restrição também estão indicados. Adaptado de Simi, 2009.

### 3. Oligonucleotídeos

Durante as etapas de clonagem, até a obtenção do vetor de expressão contendo os Fabs de interesse, foram utilizados vários oligonucleotídeos como iniciadores nas reações de PCR e sequenciamento. Com exceção dos oligonucleotídeos M13 Universal, M13 Reverso, SP6 e T7, que são da Promega, todos os outros utilizados nesse trabalho foram desenhados por Simi e sintetizados pela *Integrated DNA Technologies - IDT*®. A Tabela 2 mostra as seqüências e aplicações de cada um deles e a Figura 9 mostra as regiões de anelamento dos primers para sequenciamento do cassete do Fab D12 clonado no pPIgLe Fab.

Tabela 2. Iniciadores utilizados.

Oligo	Sequência	Aplicação
M13 Universal	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'	Sequenciamento de fragmentos clonados nos vetores pGEM-T Easy ou pGEM-T Easy VH, CH1Kex,VL.
M13 Reverso	5' CAGGAAACAGCTATGAAC 5'	Sequenciamento de fragmentos clonados nos vetores pGEM-T Easy ou pGEM-T Easy VH, CH1Kex,VL.
SP6	5' ATTTAGGTGACACTATAGAA 3'	Sequenciamento de fragmentos clonados nos vetores pGEM-T Easy ou pGEM-T Easy VH, CH1Kex,VL.
T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	Sequenciamento de fragmentos clonados nos vetores pGEM-T Easy ou pGEM-T Easy VH, CH1Kex,VL.
5' VL BglII	5' GCTACCGTGGCCCAGGCGGC <u>AGATCT</u> IGCTC 3'	Iniciador de PCR para amplificação da cadeia VL a partir da extremidade 5' que insere o sítio de restrição para Bgl II.
3' VL XhoI	5' GAAGACAGCT <u>CGAGGG</u> CAGCCACAGT 3'	Iniciador de PCR para amplificação da cadeia VL a partir da extremidade 3' que insere o sítio de restrição para Xho I.
5' VH SacI	5' ACCCAGCCATGGAGCT <u>CGTGC</u> AGCTG 3'	Iniciador de PCR para amplificação da cadeia VH a partir da extremidade 5' que insere o sítio de restrição para Sac I.
5' VH XmaI	5' GTCGCCCAAG <u>CCCGG</u> CCGAG 3'	Iniciador de PCR para amplificação da cadeia VH a partir da extremidade 5' que insere o sítio de restrição para Xma I.
3' VH XbaI	5' GGAAGACCGATGGGCCCTT <u>CTAG</u> AGGC 3'	Iniciador de PCR para amplificação da cadeia VH a partir da extremidade 3' que insere o sítio de restrição para Xba I.
1	5' CAAACGATGAGATTTCCCTTC 3'	Sequenciamento <i>forward</i> da região 5' AOX do pPIgLe Fab.
2	5' TGGCAAAACAGCAACATC 3'	Sequenciamento reverso da região 5' AOX do pPIgLe Fab.
3	5' ATAAATACTACTATTGCCAGCATT 3'	Sequenciamento <i>forward</i> da região 5' AOX do pPIgLe Fab.
4	5' ACAGCTTGGGTACAGT 3'	Sequenciamento reverso da região 5' AOX com anelamento no VH do pPIgLe Fab.
5	5' CATCGGTCTTCCCCCTGG 3'	Sequenciamento <i>forward</i> do domínio CH1 do pPIgLe Fab.
6	5' AGGTGCTCTTGGAGGAG 3'	Sequenciamento reverso do domínio CH1 do pPIgLe Fab.
7	5' ATGGACAAAAGTGCTCC 3'	Sequenciamento <i>forward</i> da região Kex do pPIgLe Fab.
8	5' CCTCGTGAAAACAGGTA 3'	Sequenciamento reverso da região Kex do pPIgLe Fab.
9	5' CGAGCCATCTGTCTTCAT 3'	Sequenciamento <i>forward</i> do domínio Ck do pPIgLe Fab.
10	5' TGCTCGTCGGATGGTGG 3'	Sequenciamento reverso do domínio Ck do pPIgLe Fab.
11	5' TTCTCGTAAGTGCCCAA 3'	Sequenciamento reverso da região 3' AOX do pPIgLe Fab.

Os sítios reconhecidos por endonucleases de restrição estão sublinhados

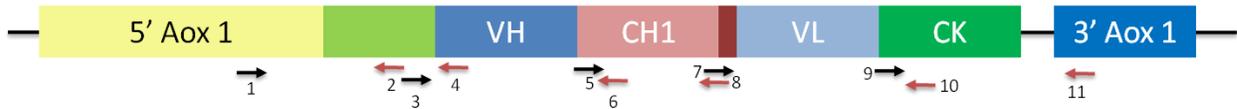


Figura 9. Cassete clonado no vetor pPIgLe Fab e locais de anelamento de cada um dos iniciadores utilizados no seu sequenciamento.

#### 4. Amplificação dos segmentos gênicos codificadores dos domínios VH e VL por PCR

Os segmentos gênicos codificadores dos domínios VH e VL dos três Fabs (D12, E11 e F8) foram separadamente amplificados a partir do vetor pCOMB 3X. Os primers 5' e 3' utilizados foram aqueles descritos na Tabela 2.

##### - Materiais:

Materiais	Concentração
DNA molde	10 – 50 ng
Iniciador 5'	10 $\mu$ M
Iniciador 3'	10 $\mu$ M
Solução de dNTPs (Promega)	10 mM
Solução de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ )	2 mM
Tampão da Taq DNA Polimerase (Cenbiot/RS) 10X	1X
Taq DNA Polimerase (Cenbiot/RS)	0,5 U/reacção

##### - Método:

Todas as reações foram montadas em um volume final de 50  $\mu$ L em água MilliQ. As reações de PCR foram realizadas no termociclador Eppendorf ajustado para as seguintes condições:

Passo	Nº de ciclos	Temperatura	Tempo
1	1	94 °C	3 minutos
2	30		
<b>Desnaturação</b>		94 °C	1 minuto
<b>Anelamento</b>		60 °C	1,5 minuto
<b>Elongação</b>		72 °C	2 minutos
3	1	72 °C	10 minutos

Após a PCR, os fragmentos amplificados foram adenilados, para permitir a clonagem individual no vetor pGEM-T Easy (Promega), em uma segunda reação de PCR utilizando-se exatamente as mesmas condições descritas acima porém fornecendo apenas o dATP no lugar dos dNTPs. Esses fragmentos foram purificados utilizando o kit Montage PCR (Millipore) ou o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) segundo instruções dos fabricantes.

## 5. Digestão enzimática (Adaptado de Azevedo *et al*, 2003)

Durante as etapas de clonagem, os plasmídeos foram digeridos com diversas enzimas de restrição para permitir a montagem dos cassetes de expressão dos três Fabs no vetor de expressão pIlgLe Fab. As reações de digestão foram sempre realizadas seguindo as instruções dos fabricantes das enzimas.

### 5. 1. Endonucleases de restrição utilizadas nesse trabalho

#### - Biolabs

Bgl II (cat # R0144L – 10U/μL)

Sac I (cat # R0156L – 20U/μL)

Xba I (cat # R0145L – 20U/μL)

Xma I (cat # R0180L – 10U/μL)

**- Fermentas**

Bgl II (cat # FD0084 – Fast Digest)

Cfr9 I (cat # ER0172 – 10U/ $\mu$ L)Sac I (cat # ER1131 – 10U/ $\mu$ L)

Sac I (cat # FD1133- Fast Digest)

Sal I (cat # ER0641 – 10U/ $\mu$ L)

Sal I (cat # FD0648 – Fast Digest)

Xba I (cat # ER0685 – 3U/ $\mu$ L)

Xho I (cat # FD0694 – Fast Digest)

**6. Eletroforese em gel de agarose (Adaptado de De-Souza em Azevedo *et al*, 2003)****- Materias:****Tampão de corrida TBE 10X**

Tris-base	0,89M
Ácido bórico	0,89M
EDTA pH 8,0	0,02M
dH <sub>2</sub> O	q. s. p. 1L

**Tampão de corrida TAE 50X**

Tampão Tris-acetato	2M
Tris-base	242g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA pH 8,0	0,05M
dH <sub>2</sub> O	q. s. p. 1L

**Tampão de amostra para gel de agarose 10X**

Tampão de corrida TEB 20X	50% (v/v)
Glicerol	50% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

Xileno Cianol 0,1% (p/v)

### **Brometo de etídio 20.000X**

Brometo de etídio 10mg/mL

### **Marcadores moleculares**

- 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen – cat # 10787-026)
- Low mass DNA Ladder (Invitrogen – cat # 10068-013)
- High mass DNA Ladder (Invitrogen – cat # 10496-016)

### **Colunas Ultrafree DA Centrifugal Unit (Millipore – cat # 42600)**

### **QIAquick Gel extraction kit da Qiagen (Qiagen - cat # 28704)**

#### **- Métodos:**

#### **6. 1. Análise de DNA plasmidial em gel de agarose**

O gel foi preparado, com concentrações de agarose entre 0,7 e 1,2% (p/v) e contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, em tampão TBE 1X de acordo com a amostra a ser analisada. As amostras foram diluídas em tampão de amostra para gel de agarose, aplicadas no gel e submetidas à eletroforese em tampão TBE 0,5X. Quando foi necessária a eluição dos fragmentos de DNA, o tampão TBE 1X foi substituído pelo TAE 1X. Para visualização do DNA incidiu-se luz ultravioleta sobre o gel por meio de aparelho transiluminador (UVP-Upland) e a imagem foi capturada por aparato de fotodocumentação.

#### **6. 2. Eluição de fragmentos de DNA a partir do gel de agarose (*Freeze Squeeze*) (Adaptado de Barbas *et al*, 2001)**

- 1) Cortar do gel de agarose a banda contendo o fragmento de DNA de interesse.

- 2) Preparar um envelope de parafilme e inserir a banda dentro. Incubar a - 20 °C durante a noite ou durante duas horas a - 80 °C.
- 3) Com o auxílio de uma espátula, macerar a banda congelada dentro do parafilme até que fique praticamente líquida.
- 4) Colocar o gel macerado na coluna Ultra-Free DA Centrifugal Unit (Millipore) e centrifugar a 12.000 x g durante 5 minutos em temperatura ambiente.
- 5) Coletar o líquido em um tubo eppendorf e adicionar 0,5 v de acetato de amônio 7,5M, 1 v de etanol absoluto e 2 µL de glicogênio. Incubar a - 20 °C durante, no mínimo, duas horas.
- 6) Centrifugar a 13.000 x g durante 45 minutos à 4 °C. Descartar o sobrenadante.
- 7) Adicionar, sem ressuspender o sedimento, 400 µL de etanol 70% e repetir a centrifugação nas mesmas condições anteriores, porém durante 15 minutos. Descartar o sobrenadante.
- 8) Secar o sedimento à temperatura ambiente e então ressuspendê-lo em 20 µL de tampão TE ou água MilliQ. Estocar o DNA a -20 °C.

## **7. Ligação de fragmentos de DNA**

### **7. 1. Ligação de produtos de PCR adenilados no vetor pGEM-T Easy**

Esse vetor comercial é fornecido pela Promega em um kit contendo o vetor linearizado, a enzima T4 DNA ligase, o tampão da enzima ligase 2X e um fragmento de PCR controle. Para a clonagem dos produtos de PCR obtidos nesse trabalho no vetor em questão foram utilizados: 1 µL do vetor, 25 ng do inserto de PCR, 1 µL da enzima T4 DNA ligase e 5 µL do tampão da enzima ligase 2X, em um volume final de 10 µL. O sistema de ligação foi então incubado a 4 °C durante a noite. Após esse período o sistema de ligação foi transformado em *E. coli*.

## 7. 2. Ligação de fragmentos de DNA obtidos por digestão

Os sistemas de ligação entre vetores e insertos digeridos pelas mesmas enzimas de restrição, para haver possibilidade de ligação das extremidades, foram montados utilizando concentrações de cada um deles baseadas na seguinte fórmula (adaptado de Simi, 2009):

$$\frac{\text{ng vetor} \times \text{tamanho do inserto em pb} \times \text{razão inserto}}{\text{tamanho do vetor em pb}} = \frac{\text{ng de inserto}}{\text{vetor}}$$

Foram utilizadas razões molares de 1:3 e 1:5 (vetor:inserto), a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen – 1U/μL) e seu respectivo tampão. Incubou-se a 16 °C durante a noite e então os sistemas de ligação foram utilizados para transformar *E. coli*.

## 8. Meios de cultura

### 8. 1. Para *E. coli* (Maranhão em Azevedo *et al*, 2003)

#### LB (Luria Bertani)

Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Peptona de caseína	1,0% (p/v)
Cloreto de sódio	1,0% (p/v)

Preparado em água destilada, ajustado o pH para 7,2 e autoclavado a 120 °C durante 20 minutos.

#### LB ágar

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico 1,4% (p/v) antes da autoclavagem.

**SB (Super Broth)**

Extrato de levedura	2,0% (p/v)
Peptona de caseína	3,0% (p/v)
MOPS	1,0% (p/v)

Preparado em água destilada, ajustado o pH para 7.2 e autoclavado a 120 °C durante 20 minutos.

**SOB**

Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Bacto-triptona	2,0% (p/v)
Cloreto de sódio	0,06% (p/v)
Cloreto de potássio	0,002% (p/v)

Preparado em água destilada, ajustado o pH para 7,2 e autoclavado a 120 °C durante 20 minutos.

**SOC**

Meio SOB	98 mL
Solução de Mg 2M	1 mL
Glicose 2M	1 mL

**Solução de Mg 2M**

MgCl <sub>2</sub>	1M
MgSO <sub>4</sub>	1M

Preparada em água destilada e filtrada em filtro Millipore 0,22µm. Estocada a 4 °C.

**Glicose 2M**

Preparada em água destilada e filtrada em filtro Millipore 0,22µm. Estocada a 4 °C.

## 8. 2. Para *P. pastoris* (Invitrogen, 2010)

### YPD (*Yeast, peptone, dextrose*)

Extrato de levedura	1,0% (p/v)
Peptona de caseína	2,0% (p/v)
Glicose	2,0% (p/v)

Preparado em água destilada e autoclavado a 120 °C durante 20 minutos.

### MD (*Meio mínimo com glicerol*)

YNB ( <i>Yeast Nitrogen Base</i> ) sem aminoácidos	1,34% (p/v)
Glicerol	5,0% (v/v)
Biotina	4x10 <sup>-5</sup> % (p/v)

### MM (*Meio mínimo com metanol*)

YNB ( <i>Yeast Nitrogen Base</i> ) sem aminoácidos	1,34% (p/v)
Metanol	1,0% (v/v)
Biotina	4x10 <sup>-5</sup> % (p/v)

### BMGY (*Meio de crescimento com glicerol*)

Extrato de levedura	1,0% (p/v)
Peptona de caseína	2,0% (p/v)
YNB ( <i>Yeast Nitrogen Base</i> ) sem aminoácidos	1,34% (p/v)
Glicerol	5,0% (v/v)
Biotina	4x10 <sup>-5</sup> % (p/v)
Tampão fosfato pH 6,0	100mM

### BMMY (*Meio de indução com metanol*)

Extrato de levedura	1,0% (p/v)
Peptona de caseína	2,0% (p/v)
YNB ( <i>Yeast Nitrogen Base</i> ) sem aminoácidos	1,34% (p/v)
Metanol	1,0% (v/v)

Biotina	$4 \times 10^{-5}\%$ (p/v)
Tampão fosfato pH 6,0	100mM

### **Tampão Fosfato 1M**

Fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	118g
Fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	23g

Preparado em água destilada para o volume final de 1 litro, ajustado o pH para 6,0 e autoclavado a 120 °C durante 20 minutos.

Nota: Tanto o YNB quanto a biotina são sensíveis ao calor, portanto não podem ser autoclavados. Para utilização nos meios descritos acima esses componentes são adicionados após a autoclavagem. Para isso prepara-se soluções concentradas de cada um deles e esteriliza-se por filtração com filtro Millipore 0,22  $\mu\text{m}$ . Essas soluções devem ser mantidas ao abrigo da luz e a 4°C.

## **9. Antibióticos**

### **Ampicilina 20mg/mL**

Antibiótico utilizado para seleção de clones bacterianos transformados com os plasmídeos descritos anteriormente. Para utilização em culturas dilui-se essa solução 200 vezes.

### **Tetraciclina 50mg/mL**

Antibiótico utilizado para isolamento de colônias das linhagens XL-1 Blue e XL-10 Gold para preparação de células competentes. Para utilização em culturas dilui-se essa solução 200 vezes.

## 10. Transformação bacteriana (Adaptado de Maranhão em Azevedo *et al*, 2003)

Nota: Quando o plasmídeo utilizado na transformação era o pGEM-T Easy no qual havia um fragmento de PCR clonado, utilizou-se nas placas de LB ágar, além da ampicilina, o IPTG e o X-Gal para permitir a seleção de colônias azuis e brancas. Qualquer outro vetor utilizado nesse trabalho não permite esse tipo de seleção.

### X-Gal

X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-idolil- $\beta$ -D-galactosídeo) 2,5% (p/v)

Preparado em NN-dimetilformamida e estocado a -20 °C. Utilizado para seleção de colônias azuis e brancas em bactérias transformadas com o vetor pGEM-T Easy, fazendo uma diluição de 100 vezes dessa solução.

### IPTG

IPTG (isopropil-tio- $\beta$ -D-galactosídeo) 100mM

Preparado em água destilada, filtrado em filtro Millipore 0,22 $\mu$ m e estocado a -20 °C. Utilizado para seleção de colônias azuis e brancas em bactérias transformadas com o vetor pGEM-T Easy, fazendo uma diluição de 1000 vezes dessa solução.

### 10. 1. Transformação por choque térmico

#### - Materiais:

#### Cloreto de cálcio

Cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 50mM

Preparado em água destilada, autoclavado a 120 °C durante 20 minutos e estocado a 4 °C.

#### Tubos de vidro de hemólise estéreis

**- Método:****Preparo de células competentes e transformação por choque térmico**

1) Inocular uma colônia isolada em 5 mL de meio LB contendo antibiótico (tetraciclina para XL-1 Blue e tetraciclina ou cloranfenicol para XL-10 Gold) e incubar à 37 °C sob agitação de 200 rpm durante a noite (pré-inóculo).

2) Utilizar 500 µL desse pré-inóculo para inocular 50 mL de meio LB e incubar à 37 °C sob agitação de 200 rpm até a cultura atingir OD 0,1 – 0,3.

3) Coletar as células por centrifugação a 3.000 x g durante 15 minutos à 4 °C, em um tubo estéril. Descartar o sobrenadante.

Nota: A partir desse passo é fundamental que as células sejam sempre mantidas resfriadas para evitar a perda de eficiência.

4) Ressuspender cuidadosamente o sedimento celular em 10 mL de solução de Cloreto de cálcio 50 mM estéril e gelada.

5) Centrifugar a 3.000 x g durante 15 minutos à 4 °C. Descartar o sobrenadante.

6) Ressuspender cuidadosamente o sedimento celular em 1 mL de solução de Cloreto de cálcio 50 mM estéril e gelada. Incubar em banho de água e gelo durante uma hora.

6) Fazer alíquotas de 100 µL das células competentes em tubos eppendorf e utilizá-las em no máximo 24 horas.

Nota: a eficiência de transformação das células competentes é inversamente proporcional ao tempo decorrido entre seu preparo e sua utilização.

7) Incubar, dentro de um tubo de hemólise estéril, 200-500 ng do plasmídeo de interesse com 100-200 µL de células competentes durante 30 minutos em banho de água e gelo.

8) Proceder o choque térmico incubando o tubo durante 3 minutos à 42 °C.

9) Imediatamente, adicionar 1 mL de meio LB ao tubo e incubar durante uma hora à 37 °C.

10) Semear 300 e 900 µL em placas contendo LB ágar com ampicilina. Incubar à 37 °C até que surjam colônias.

## 10. 2. Transformação por eletroporação

### - Materias:

#### **Glicerol 10%**

Glicerol 10% (v/v)

Preparado em água destilada e autoclavado a 120 °C durante 20 minutos. Estocar a 4 °C.

**Cubetas de eletroporação 0,2 cm** (BioAgency cat #165-2086N)

### - Método:

#### **Preparo de células competentes e transformação por eletroporação**

- 1) Inocular uma colônia isolada em 10 mL de meio SB contendo antibiótico (tetraciclina para XL-1 Blue e tetraciclina ou cloranfenicol para XL-10 Gold) e incubar à 37 °C sob agitação de 200 rpm durante a noite (pré-inóculo).
- 2) A partir de 1 mL desse pré-inóculo, inocular 500 mL de meio SB contendo 2,5 mL da solução de Glicose 2M e 2,5 mL da solução de Mg 2M. Incubar à 37 °C sob agitação de 200 rpm até a cultura atingir OD 0,7 – 0,9.
- 3) Coletar as células por centrifugação a 3.000 x g durante 20 minutos à 4 °C, em um tubo estéril. Descartar o sobrenadante.  
Nota: A partir desse passo é fundamental que as células sejam sempre mantidas resfriadas para evitar a perda de eficiência.
- 4) Ressuspender cuidadosamente o sedimento celular em 25 mL de solução de Glicerol 10% estéril e gelado. A seguir adicionar mais 75 mL de Glicerol 10% e homogeneizar invertendo o tubo.
- 5) Centrifugar a 3.000 x g durante 20 minutos à 4 °C. Descartar o sobrenadante.
- 6) Repetir os passos 4 e 5.

- 7) Ressuspender cuidadosamente o sedimento celular em 25 mL de solução de Glicerol 10% estéril e gelado.
- 8) Centrifugar a 3.000 x g durante 20 minutos à 4 °C. Descartar o sobrenadante.
- 9) Ressuspender cuidadosamente o sedimento celular em 1 mL de solução de Glicerol 10% estéril e gelado.
- 10) Fazer alíquotas de 100 µL das células competentes em tubos eppendorf. Congelar em banho de gelo seco e etanol e estocar imediatamente à -80 °C.
- 11) Resfriar a cubeta no gelo e adicionar, evitando a formação de bolhas, 100 µL da célula competente junto com 10-200 ng do plasmídeo de interesse. Incubar no gelo por 5 minutos
- 12) Proceder o choque elétrico em eletroporador (*Gene Pulser com Pulser Controler* da BioRad) ajustado para os seguintes parâmetros: 2,5 kV, 25 µF e 200 Ω. O tempo de choque esperado é de 4,0-5,0 milisegundos.
- 13) Imediatamente recuperar as células lavando a cubeta com 3 mL de meio SOC e transferir para um Falcon estéril. Incubar durante uma hora sob agitação de 200 rpm à 37 °C.
- 14) Semear 1, 10, 50 e 100 µL em placas contendo LB ágar com ampicilina. Incubar à 37 °C até que surjam colônias.

## 11. Soluções de uso geral

### Azida sódica

Azida sódica (NaN<sub>3</sub>)                      5% (p/v)

Preparada em água destilada. Essa solução é diluída dez vezes e utilizada para evitar contaminações em outras soluções.

### PMSF (Phenilmethylsulfonyl fluoride)

PMSF    0,2M

Preparado em isopropanol e diluído para evitar degradação de proteínas no sobrenadante de cultura de *P. pastoris*. É um inibidor de serino-proteases.

**EDTA (Ácido tetracético etilenodiamina)**

EDTA 0,5M

Preparado em água destilada e ajustado o pH para 8,0. É um inibidor de metaloproteases utilizado para evitar degradação proteica no sobrenadante de cultura de *P. pastoris*.

**Tampão TE (Tris-EDTA)**

Tris-HCl pH 8,0 10mM

EDTA pH 8,0 1mM

**12. Preparação de DNA plasmidial (Adaptado de Maranhão & Moraes em Azevedo et al, 2003)****- Materiais:****Solução I**

Tris-HCl pH 8,0 25mM

EDTA pH 8,0 10mM

Glicose 50mM

**Solução II**

Hidróxido de sódio (NaOH) 0,2M

SDS (Docecil sulfato de sódio) 0,1% (p/v)

**Solução II**

Acetato de potássio 3M

Ácido acético 2M

Ajustado o pH para 4.8-5.0.

**RNase A** (Invitrogen cat #12091-021)

**Clorofane**

Fenol equilibrado	1 v
Clorofórmio	1 v
$\beta$ -hidroxiquinilona	0,05% (p/v)

Equilibrado com Tris-HCl 100mM pH 7.6.

**Clorofil**

Clorofórmio	24 v
Álcool isoamílico	1 v

Equilibrado com 0,25 v de tampão TE.

**Isopropanol absoluto****Etanol absoluto****Etanol 70%**

Diluído em água destilada.

**Acetato de amônio**

Acetato de amônio	7,5M
-------------------	------

Preparado em água destilada.

**Glicogênio**

Glicogênio	20mg/mL
------------	---------

**- Métodos:****12. 1. Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (Miniprep)**

1) Cultivar as células transformadas em 3 mL de meio LB contendo ampicilina a 37 °C sob agitação de 200 rpm durante a noite.

- 2) Coletar as células por centrifugação a 5.000 rpm durante 5 minutos e descartar o sobrenadante.
- 3) Ressuspender as células em 200  $\mu$ L de Solução I e incubar no gelo por 5 minutos.
- 4) Adicionar 400  $\mu$ L de Solução II, preparada na hora, e homogeneizar invertendo o tubo várias vezes. Incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente.
- 5) Adicionar 300  $\mu$ L de Solução III e homogeneizar da mesma forma. Incubar no gelo durante 10 minutos.
- 6) Centrifugar a amostra em 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
- 7) Transferir o sobrenadante para um tubo de 1,5 mL limpo e adicionar 5  $\mu$ L de RNase A. Incubar a 37 °C durante uma hora.
- 8) Adicionar 300  $\mu$ L de clorofane e homogeneizar no vórtex durante 1 minuto.
- 9) Centrifugar a 5.000 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente. Transferir a fase aquosa (superior) para um novo tubo.
- 10) Adicionar 300  $\mu$ L de clorofil e repetir a homogeneização no vórtex.
- 11) Centrifugar nas mesmas condições do passo 10 e transferir a fase aquosa (superior) para um novo tubo.
- 12) Adicionar 2 v de etanol absoluto, 0,5 v de acetato de amônio e 2  $\mu$ L de glicogênio. Incubar a -20 °C durante, no mínimo, duas horas.
- 13) Centrifugar a 13.000 x g durante 45 minutos à 4 °C. Descartar o sobrenadante.
- 14) Adicionar, sem ressuspender o sedimento, 400  $\mu$ L de etanol 70% e repetir a centrifugação nas mesmas condições anteriores, porém durante 15 minutos. Descartar o sobrenadante.
- 15) Secar o sedimento à temperatura ambiente e então ressuspendê-lo em 30  $\mu$ L de tampão TE ou água MilliQ. Estocar o DNA a -20 °C.

## **12. 2. Preparação de DNA plasmidial em larga escala (Maxiprep)**

- 1) Cultivar as células transformadas em 200 mL de meio LB contendo ampicilina a 37 °C sob agitação de 200 rpm durante a noite.
- 2) Coletar as células por centrifugação a 5.000 rpm durante 5 minutos e descartar o sobrenadante.

- 3) Ressuspender as células em 5 mL de Solução I e incubar no gelo por 5 minutos.
- 4) Adicionar 10 mL de Solução II, preparada na hora, e homogeneizar invertendo o tubo várias vezes. Incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente.
- 5) Adicionar 7,5 mL de Solução III e homogeneizar da mesma forma. Incubar no gelo durante 20 minutos.
- 6) Centrifugar a amostra em 10.000 x g durante 30 minutos a 4 °C.
- 7) Coletar o sobrenadante e filtrando em papel de filtro.
- 8) Adicionar 0,6 v de isopropanol e incubar à temperatura ambiente por 5 minutos.
- 9) Centrifugar a 12.000 x g durante 20 minutos à temperatura ambiente. Descartar o sobrenadante.
- 10) Secar o sedimento por simples exposição ao ar e ressuspendê-lo em 500 µL de tampão TE.
- 11) Adicionar 10 µL de RNase A e incubar à 37 °C durante uma hora.
- 12) Adicionar 1 v de clorofane e homogeneizar no vórtex durante 2 minutos.
- 13) Centrifugar a 5.000 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente. Transferir a fase aquosa (superior) para um novo tubo.
- 14) Repetir os passos 12 e 13.
- 15) Adicionar 1 v de clorofil e repetir a homogeneização no vórtex.
- 16) Centrifugar nas mesmas condições do passo 10 e transferir a fase aquosa (superior) para um novo tubo.
- 17) Adicionar 2 v de etanol absoluto, 0,5 v de acetato de amônio 7,5M e 2 µL de glicogênio. Incubar a -20 °C durante, no mínimo, duas horas.
- 18) Centrifugar a 13.000 x g durante 45 minutos à 4 °C. Descartar o sobrenadante.
- 19) Adicionar, sem ressuspender o sedimento, 1 mL de etanol 70% e repetir a centrifugação nas mesmas condições anteriores, porém durante 15 minutos. Descartar o sobrenadante.
- 20) Secar o sedimento à temperatura ambiente e então ressuspendê-lo em 150 µL de tampão TE ou água MilliQ. Estocar o DNA a -20 °C.

### 13. Sequenciamento

Após análise de restrição os plasmídeos foram sequenciados utilizando o sequenciador automático MegaBACE 500 plus (Molecular Dynamics®) e o kit DYEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare – cat # US81060). Em cada reação de sequenciamento foram utilizadas entre 150 e 250 ng de DNA e 5 picomoles do oligonucleotídeo apropriado. As sequências resultantes foram analisadas por meio dos softwares Phred e CAP3 (disponíveis no sítio [www.biomol.unb.br](http://www.biomol.unb.br)) para verificação de qualidade. O alinhamento com sequências depositadas foi feito por meio da ferramenta BLAST (disponível em [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) e a manipulação das sequências para confecção dos mapas dos vetores foi realizada com o auxílio do software BioEdit Sequence Alingment Editor (Hall, 2003).

### 14. Transformação de *Pichia pastoris* (Adaptado de Wu e Letchworth, 2004)

#### Sorbitol

Sorbitol 1M

Preparado em água destilada, autoclavado a 120 °C durante 20 minutos e estocado à 4°C.

#### Acetato de lítio

Acetato de lítio 1M

Preparado em água destilada, filtrado em filtro Millipore 0,22µm e estocado à 4°C.

#### DTT

DTT (Ditiotreitol) 100mM

Preparado em água destilada, filtrado em filtro Millipore 0,22µm e estocado à -20 °C.

#### Tampão pré-tratamento (TPT)

Acetato de lítio 100mM

DTT 10mM

Sorbitol	0,6M
Tris-HCl pH 7,5	10mM

Preparado em água destilada estéril.

#### **14. 1. Preparação de células competentes e transformação por eletroporação**

- 1) Inocular uma colônia isolada de GS115 em 10 mL de meio YPD e incubar a 30 °C e sob agitação de 200 rpm durante a noite (pré-inóculo).
- 2) Em 100 mL de meio YPD inocular um volume do pré-inóculo suficiente para obter uma OD<sub>600</sub> inicial de 0,3 na cultura. Incubar a cultura a 30 °C e sob agitação de 200 rpm até que alcance a OD<sub>600</sub> de 1,3 – 1,5.
- 3) Coletar as células por centrifugação a 3.000 x g durante 10 minutos à 4 °C. Descartar o sobrenadante.
- 4) Ressuspender o sedimento celular em 8 mL do tampão pré-tratamento (TPT) e incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente.
- 5) Centrifugar a 3.000 x g durante 10 minutos à 4 °C e descartar o sobrenadante.
- 6) Ressuspender o sedimento celular em 1,5 mL de Sorbitol 1M.
- 7) Centrifugar a 3.000 x g durante 10 minutos à 4 °C e descartar o sobrenadante.
- 8) Repetir os passos 6 e 7 mais duas vezes.
- 9) Ressuspender as células em 400 µL de Sorbitol 1M.
- 10) Incubar, em cubeta de eletroporação previamente resfriada, 5 – 10 µg de DNA linearizado com 80 µL de células competentes durante 5 minutos no gelo.
- 11) Proceder o choque elétrico em eletroporador (*Gene Pulser com Pulser Controler* da BioRad) ajustado para os seguintes parâmetros: 1,5 kV, 25 µF e 200 Ω. O tempo de choque esperado é de 8,0-9,0 milisegundos.
- 12) Recuperar rapidamente as células transformadas com 1 mL de Sorbitol 1M.
- 13) Semear 300 µL em placa de meio MD. Incubar à 30 °C até o aparecimento das colônias.

## 15. Detecção de clones produtores por *Colony Blot* (Adaptado de Invitrogen, 2010)

O ensaio de *Colony Blot* é realizado para detectar as colônias produtoras da proteína heteróloga entre as transformantes crescidas nas placas MD.

### - Materiais para imunodeteção dos Fabs (*Colony, Dot e Western Blot*)

#### Tampão PBS (*Phosphate saline buffer*)

Cloreto de sódio (NaCl)	150mM
Fosfato de sódio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	10mM
Azida sódica (NaN <sub>3</sub> )	0,05% (p/v)

Preparado em água destilada, ajustado o pH para 7.4 e autoclavado a 120 °C durante 20 minutos.

#### Tampão PBST

Tampão PBS acrescido de Tween 20 para concentração final de 0,1% (v/v).

#### Tampão APB (*Alkaline phosphatase buffer*)

Tris-HCl pH 9.5	100mM
Cloreto de sódio (NaCl)	100mM
Cloreto de magnésio (MgCl <sub>2</sub> )	5mM

#### Solução de bloqueio

Leite em pó desnatado 5% (p/v)

Diluído em tampão PBST.

#### Solução reveladora NBT/BCIP (Zymed – cat # 002209)

Um mililitro da solução NBT é adicionada em 8 mL de água destilada e em seguida um mililitro da solução BCIP é adicionado.

#### Membrana de nitrocelulose Hybond C-Extra (cat # RPN303E)

**Anticorpo para imunodeteccão dos Fabs**

- *Anti-human Kappa light chains (Bound and Free)* conjugado à fosfatase alcalina, produzido em cabra (Sigma Aldrich – cat # A3813)

Preparado em PBS 1X na proporção de 1 volume de anticorpo para 3.000 volumes de PBS 1X (1:3000).

**- Método:**

1) Inocular com palito de dente estéril, utilizando como base um grid, 52 colônias transformantes em placa MM e fazer a replicata em MD. Incubar à 30 °C até o aparecimento das colônias.

Nota: Adicionar 700 µL de metanol nas tampas das placas MM a cada 24 horas.

Reservar a placa MD para preservar as colônias e proceder a transferência de proteínas utilizando a placa MM.

- 2) Colocar uma membrana de nitrocelulose Hybond C-Extra sobre as colônias.
- 3) Colocar acima da membrana 8 folhas de papel filtro.
- 4) Colocar sobre o papel filtro 5 folhas de papel toalha.
- 5) Aplicar um peso sobre o sistema e incubar a 30 °C durante 1,5 hora.
- 6) Desmontar o sistema e lavar a membrana com PBST 1X por três vezes.
- 7) Incubar a membrana durante uma hora em solução de bloqueio sob leve agitação.
- 8) Lavar a membrana três vezes com PBST 1X.
- 9) Incubar a membrana com a solução de anticorpo 1:3000 durante uma hora à temperatura ambiente e sob leve agitação.
- 10) Lavar a membrana duas vezes com PBST 1X.
- 11) Incubar a membrana em tampão APB durante 3 minutos.
- 12) Revelar utilizando a solução reveladora NBT/BCIP.
- 13) Parar a reação de revelação lavando a membrana com água destilada e secar com papel toalha.

## 16. Expressão heteróloga em *Pichia pastoris* (Adaptado de Invitrogen, 2010)

A expressão heteróloga dos Fabs, por ser controlada pelo promotor AOX1, só ocorre quando o metanol é fornecido como única fonte de carbono, permitindo o controle sobre o momento em que a produção acontecerá. Sendo assim a produção dos Fabs é dividida em duas etapas consecutivas: crescimento, onde ocorre o acúmulo de biomassa, e indução, onde ocorre a produção da proteína heteróloga pelas células acumuladas na primeira etapa.

### 16. 1. Etapa de crescimento

- 1) Inocular uma colônia isolada produtora da proteína heteróloga, detectada pelo *Colony Blot*, em 10 mL de meio MD. Incubar à 30 °C sob agitação de 200 rpm durante a noite (pré-inóculo).
- 2) Inocular 100 mL de meio BMGY com 1 mL do pré-inóculo. Incubar à 30 °C sob agitação de 200 rpm até atingir OD<sub>600</sub> entre 15 – 20.
- 3) Coletar as células por centrifugação a 3.000 x g durante 15 minutos à 4 °C. Coletar uma amostra (t<sub>0</sub>) de 5 mL e descartar o restante do sobrenadante.

### 16. 2. Etapa de indução

- 4) Ressuspender o sedimento celular em 100 mL de meio BMMY adicionado de PMSF 1 mM e EDTA 2,5 mM.
- 5) A cada 12 horas, coletar amostras para acompanhar a produção da proteína de interesse e adicionar 1 mL de metanol e 1mL de PMSF.
- 6) Ao final da indução, centrifugar a 3.000 x g durante 15 minutos à 4 °C. Coletar o sobrenadante contendo o Fab e descartar as células.
- 7) Filtrar o sobrenadante em filtro 0,45 µm para eliminar as células e adicionar PMSF e EDTA.

Nota: Estocar a – 20 °C se não for utilizar imediatamente.

## 17. Imunodeteccção dos Fabs por *Dot Blot*

As soluções e a metodologia utilizadas para realização do *Dot Blot* são as mesmas do *Colony Blot*. A diferença é apenas que no *Dot* a proteína heteróloga é detectada a partir do sobrenadante de uma cultura que é diretamente aplicado (2  $\mu$ L) sobre a membrana de nitrocelulose.

## 18. Concentração e diálise dos sobrenadantes de cultura de *Pichia pastoris*

Para permitir a purificação de um grande volume de sobrenadante foi necessário realizar sua concentração e diálise contra o tampão de ligação da coluna de HisTrap utilizando o QuixStand Benchtop System (GE Healthcare) segundo instruções do fabricante. Durante esse processo as proteínas menores do que 10 kDa foram excluídas.

### - Materiais:

Filtro de poro 0,45  $\mu$ m Millex-HV (Millipore – cat # SLHV033RB)

QuixStand Benchtop System (GE Healthcare) cat # QSM-04SAP

### Tampão de ligação (*Binding Buffer* – BB) da coluna HisTrap

Fosfato de sódio 20mM

Imidazol 20mM

Cloreto de sódio 0,5M

Preparado em água destilada, ajustado o pH para 7,4 e filtrado em filtro Millipore 0,45 $\mu$ m.

### - Método:

1) Filtrar o sobrenadante contendo a proteína de interesse em filtro de poro de 0,45  $\mu$ m.

- 2) Diluir o sobrenadante para o volume final de 1 litro no tampão de ligação da coluna de purificação.
- 3) Aplicar o sobrenadante diluído no reservatório do QuixStand após seu enxágue com água destilada morna em abundância.
- 4) Permitir que o sobrenadante circule com a bomba peristáltica ajustada para 35 rpm e a válvula de retorno ajustada no número 4, mantendo a pressão em 10 PSI, coletando o *flow-through*.
- 5) Após a passagem de 900 mL completar o volume com o tampão de ligação da coluna HisTrap e permitir a circulação agora com bomba ajustada para 60 rpm e a válvula de retorno praticamente fechada, coletando o *flow-through*.
- 6) Repetir o passo 5 por mais 3 vezes.
- 7) Deixar que reste apenas 50 mL e coletar o líquido invertendo o fluxo da bomba peristáltica. Nele se encontram as proteínas heterólogas.

## 19. Purificação por cromatografia de afinidade

A purificação dos Fab foi realizada por cromatografia de afinidade por meio da coluna *HisTrap FF crude 5 mL* (GE Healthcare – cat # 17-5286-02) em protocolo adaptado a partir das instruções do fabricante. A coluna é composta por uma resina de *Sepharose* ligada à ions  $\text{Ni}^{2+}$  que interagem, com alta afinidade, com o anel de histidinas formado pela cauda 6xHIS do Fab. O imidazol compete por essa ligação ao níquel e portanto, em altas concentrações, tem a capacidade de desligar os Fabs da resina e permitir sua eluição.

### - Materiais:

#### Tampão de ligação (*Binding Buffer – BB*)

Fosfato de sódio	20mM
Imidazol	20mM
Cloreto de sódio	0,5M

Preparado em água destilada, ajustado o pH para 7,4 e filtrado em filtro Millipore 0,45µm.

### **Tampão de eluição (*Elution Buffer* – EB)**

Fosfato de sódio	20mM
Imidazol	500mM
Cloreto de sódio	0,5M

Preparado em água destilada, ajustado o pH para 7,4 e filtrado em filtro Millipore 0,45µm.

### **Etanol 20%**

Etanol absoluto	10mL
dH <sub>2</sub> O	40 mL

### **Bomba peristáltica P1 P-1 (Pharmacia – cat # 1322)**

#### **- Método:**

- 1) Corrigir o pH do sobrenadante concentrado e dialisado para 7.4 (amostra).
- 2) Lavar a coluna passando 30 mL de água destilada.

Nota: Em todos os passos utilizar um fluxo de 2 mL/minuto.

- 3) Equilibrar a coluna passando 50 mL do BB.
- 4) Passar a amostra pela coluna.

Nota: Coletar o líquido que sair da coluna (*flow-through*) para verificar se a proteína esta realmente se ligando ao níquel e a eficiência dessa ligação.

- 5) Lavar a coluna com 60 mL de BB coletando o líquido que sair em alíquotas de 4 mL (L1 a L15).
- 6) Eluir as proteínas passando 40 mL do EB pela coluna, coletando o líquido que sair em alíquotas de 4 mL (E1 a E10).
- 7) Lavar a coluna com 40 mL de BB coletando o líquido que sair em alíquotas de 4 mL (L16 a L25).

- 8) Passar 30 mL de água destilada pela coluna para limpar os resquícios dos tampões.  
 9) Passar 30 mL de etanol 20% pela coluna e estocar a 4 °C com o etanol dentro.  
 11) Fazer um *Dot Blot* aplicando todas as amostras coletadas (*flow-through*, L1 a L15, E1 a E10, L16 a L25) e verificar se a purificação foi bem sucedida.

## 20. SDS-PAGE (Adaptado de Silva-Pereira em Azevedo *et al*, 2003)

### Tampão de corrida para SDS-PAGE 5X

Tris-base	125M
Glicina	125mM
SDS	0,5% (p/v)

### Tampão de amostra redutor para SDS-PAGE 5X

Tris-HCl pH 6.8	250mM
Glicerol	50% (v/v)
SDS	10% (p/v)
$\beta$ -mercaptoetanol	10% (v/v)
Azul de bromofenol	0,5% (p/v)

### Acrilamida 30% (29:1)

Acrilamida	145g
Bis-acrilamida	5g
dH <sub>2</sub> O	q. s. p. 500 mL

### Tris-HCl 1,5M pH 8.8

Tris-base	36,34g
dH <sub>2</sub> O	q. s. p. 200 mL

### Tris-HCl 0,5M pH 6.8

Tris-base	12,11g
dH <sub>2</sub> O	q. s. p. 200 mL

**SDS 10%**

SDS	10g
dH <sub>2</sub> O	q. s. p. 100 mL

**APS 10%**

APS (Persulfato de amônio)	100mg
dH <sub>2</sub> O	q. s. p. 1 mL

**TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilenodimetilamina) (Fluka BioChemika)****Marcador molecular**

- *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Fermentas – cat # SM1842)
- *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen – cat # 10784-010)

**Gel concentrador SDS-PAGE**

Acrilamida/Bis-acrilamida 29:1	4% (p/v)
Tri-HCl pH 8.8	125mM
SDS	0,1% (p/v)
APS	0,1% (p/v)
TEMED	0,01% (p/v)

**Gel separador SDS-PAGE**

Acrilamida/Bis-acrilamida 29:1	10% (p/v)
Tri-HCl pH 8.8	400mM
SDS	0,1% (p/v)
APS	0,1% (p/v)
TEMED	0,01% (p/v)

**Ácido tricloroacético (TCA) (VETEC)**

## **Acetona (Vetec)**

## **Sistema de eletroforese MiniVE Vertical Electrophoresis System Complete (Amersham Bioscience)**

### **- Método:**

#### **20. 1. Precipitação de proteínas por TCA**

- 1) Em um tubo eppendorf separar uma alíquota da amostra (sobrenadante bruto ou frações da purificação).
- 2) Adicionar 1/10 do volume da amostra, de TCA. Homogeneizar invertendo o tubo.
- 3) Incubar a 4 °C durante 30 minutos.
- 4) Centrifugar a 12.000 x g durante 15 minutos à 4 °C. Descartar o sobrenadante.
- 5) Adicionar, sem ressuspender o sedimento, 500 µL de acetona gelada.
- 6) Repetir os passos 4 e 5 por mais duas vezes e depois mais uma vez o passo 4.
- 7) Secar o sedimento de proteína por simples exposição ao ar.
- 8) Ressuspender o sedimento em 20 µL de tampão de amostra redutor para SDS-PAGE 5X para aplica-la no gel de poliacrilamida.

#### **20. 2. SDS-PAGE**

- 1) Preparar o gel separador e imediatamente aplicar, evitando a formação de bolhas, no sistema de eletroforese. Esperar até que polimerize.
- 2) Colocar o pente para a formação dos poços, preparar o gel concentrador e imediatamente aplicar, evitando a formação de bolhas, no sistema de eletroforese. Esperar até que polimerize.
- 3) Abrir a parte de baixo do sistema de eletroforese e inseri-lo dentro da cuba contendo 1,2 L de tampão de corrida para SDS-PAGE 1X.
- 4) Completar a parte de dentro do sistema de eletroforese com o mesmo tampão de corrida 1X.

5) Retirar o pente e lavar os poços, fazendo *up-down* com a pipeta, para retirar resquícios de gel não polimerizado.

6) Aplicar 10 µL de cada amostra em um gel, e os outros 10 µL em outro gel, mantendo a mesma ordem das amostras, para que sejam replicatas.

Nota: Um dos géis será corado com prata para verificar a pureza da proteína heteróloga após o processo de purificação e o outro será utilizado em *Western Blot* para confirmar a presença da proteína de interesse.

7) Proceder a eletroforese mantendo-se a amperagem constante no valor 20 mA por gel.

## **21. Imunodeteção dos Fabs por *Western Blot* (Adaptado de Brígido em Azevedo et al, 2003)**

### **- Materiais:**

#### **Tampão para transferência semi-seca de proteínas**

Tris-base	48mM
Glicina	39mM
SDS	0,037% (p/v)
Metanol	20% (v/v)

#### **Sistema de transferência 2117 Multiphor II Electrophoresis Unit (LKB Bromma)**

### **- Método:**

1) Sobre o eletrodo negativo de um sistema de transferência, colocar 7 folhas de papel filtro, cortadas do mesmo tamanho que o do gel, embebidas no tampão de transferência.

2) Sobre esses papéis colocar o gel também molhado no tampão de transferência.

3) Sobre o gel, colocar uma membrana de nitrocelulose Hybond C-Extra, cortada do mesmo tamanho que o do gel, molhada no tampão de transferência.

- 4) Colocar, sobre a membrana, mais 7 folhas de papel filtro como no passo 1.
- 5) Rolar pressionando levemente o “sanduíche” montado, um falcon, para retirar bolhas.
- 6) Colocar o eletrodo positivo sobre tudo e aplicar a corrente elétrica, durante duas horas, mantendo-se a amperagem constante no valor equivalente à área dos géis.
- 7) Desmontar todo o sistema e recuperar a membrana.
- 8) Incubar a membrana em solução de bloqueio por, no mínimo, uma hora e detectar a presença da proteína heteróloga seguindo os passos de 8 a 13 descritos no item 15 sobre *Colony Blot*.

## 22. Coloração de proteínas com prata em gel de poliacrilamida

Utilizando o kit *PlusOne Silver Staining kit, Protein* (GE Healthcare - cat # 17-1150-01) segundo instruções do fabricante. Todos os reagentes e soluções são fornecidos no kit.

### - Materiais:

#### Solução de fixação

Etanol absoluto	20 mL
Ácido acético glacial	5 mL

Preparada em água destilada para o volume final de 50 mL.

#### Solução de sensibilização

Etanol absoluto	15 mL
Tiosulfato de sódio 5%	2 mL
Acetato de sódio	3,4g

Preparada em água destilada para o volume final de 50 mL. Imediatamente antes de usar adicionar 250 µL de glutaraldeído 25%.

**Solução de prata**

Nitrato de prata 2,5%                      5 mL

Preparada em água destilada para o volume final de 50 mL.

**Solução de desenvolvimento**

Carbonato de sódio                      1,25g

Preparada em água destilada para o volume final de 50 mL. Imediatamente antes de usar adicionar 40 µL de formaldeído 37%.

**Solução de parada**

EDTA – Na<sub>2</sub> . H<sub>2</sub>O                      0,73g

Preparada em água destilada para o volume final de 50 mL.

**- Método:**

1) Incubar o gel com a solução de fixação sob leve agitação durante 30 minutos.

Nota: Alternativamente pode-se deixar o gel nessa solução durante a noite.

2) Remover a solução anterior e incubar o gel com a solução de sensibilização sob leve agitação durante, no mínimo, 30 minutos.

3) Remover a solução anterior e lavar três vezes com água destilada durante cinco minutos.

4) Incubar o gel com a solução de prata sob leve agitação durante 20 minutos.

5) Descartar a solução anterior e lavar duas vezes com água destilada durante um minuto.

6) Incubar o gel com a solução de desenvolvimento sob leve agitação até que a coloração seja suficiente.

7) Descartar a solução anterior e imediatamente adicionar a solução de parada. Estocar o gel nessa última solução.

### **23. Concentração e diálise das frações eluídas na purificação**

As frações contendo o Fab mais concentrado após a purificação foram reunidas, dialisadas contra PBS 1X e concentradas para se obter um pequeno volume bastante concentrado e assim permitir a realização dos experimentos subsequentes.

#### **- Materiais:**

**Centricon YM-10 2mL (Amicon Bioseparations – cat # 4206)**

**Tampão PBS 1X**

#### **- Método:**

- 1) Preencher a coluna Centricon YM-10 com as frações eluídas contendo a proteína de interesse, detectada por *Dot Blot*.
- 2) Centrifugar a 3.000 x g durante 30 minutos à 20 °C. Coletar o líquido que passar para dentro do dispositivo (*flow-through*) para verificar se não há perda da proteína de interesse.
- 3) Completar com PBS 1X e centrifugar a 3.000 x g durante 30 minutos à 20 °C. Sempre coletar o líquido que passar para dentro do dispositivo.
- 4) Repetir o passo 3 por mais 3 vezes.
- 5) Coletar o líquido que permaneceu na coluna, ali se encontram as proteínas heterólogas.

### **24. Quantificação do Fab em gel de poliacrilamida**

Para quantificar o Fab concentrado realizou-se um SDS-PAGE onde a amostra de interesse e quantidades conhecidas da proteína BSA foram submetidas à eletroforese. O gel foi corado com prata e a quantificação do Fab D12 foi realizada por

comparação de tamanho e intensidade de sua banda com as bandas do BSA utilizando-se o software ImageJ 1.45s.

## **25. Ensaio de ligação direta (ELISA) (Adaptado de Pimentel, 2008)**

Para avaliar a ligação do Fab D12 ao peçonha de *Bothrops atrox* fez-se um teste imunoenzimático ELISA titulando-se o Fab para obtenção de uma reta que demonstrasse a relação entre a massa da proteína de interesse e a ligação dela à peçonha. Todos os testes foram realizados em triplicata.

### **- Materiais:**

**Imunoplaça de microtitulação de 96 poços MaxiSorp (Nunc Thermo Scientific– cat # 439454)**

**Peçonha de *Bothrops atrox* liofilizado - resuspenso em 2.5 mM Tris-HCl, 150 mM tampão NaCl pH 8,0 - na concentração de 20 ng/μL.**

**PBST 1X**

**Fab anti-DNA Z22 utilizado como controle negativo (Burtet, 2007).**

### **Anticorpo**

- *Anti-human Kappa light chains (Bound and Free)* conjugado à fosfatase alcalina, produzido em cabra (Sigma Aldrich – cat # A3813)

Preparado em PBS 1X na proporção de 1 volume de anticorpo para 3.000 volumes de PBS 1X (1:3000).

**pNPP (p-nitrophenyl phosphate - Substrato da fosfatase alcalina) (Invitrogen - cat #00-2201)**

## Leitor de absorvância de microplaca automatizada modelo Elx800 (Bio-Tek Instruments)

### - Método:

1) Sensibilizar os poços da placa com 150  $\mu$ L do peçonha de *B. atrox* durante a noite na geladeira.

2) Recolher o peçonha e lavar os poços três vezes com 180  $\mu$ L de PBST 1X fazendo *up and down* com a pipeta multicanal. Após as lavagens não pode haver bolhas nos poços portanto elas são retiradas batendo-se a placa contra uma superfície coberta com papel toalha.

3) Aplicar 100  $\mu$ L das amostras a serem testadas nos poços e permitir a ligação durante a noite na geladeira.

Obs: Para a titulação do Fab D12 colocou-se 150  $\mu$ L da amostra no primeiro poço, correspondendo ao total de 1200 ng do Fab. Nos cinco poços seguintes foram adicionados 100  $\mu$ L de PBS 1X. Foram retirados 50  $\mu$ L do primeiro poço e diluídos no segundo poço fazendo-se *up and down* com a pipeta. Depois de bem homogeneizado eram retirados 50  $\mu$ L do segundo poço e diluídos no terceiro da mesma maneira e assim sucessivamente até o sexto poço.

4) Recuperar as amostras e repetir a lavagem dos poços com PBST 1X.

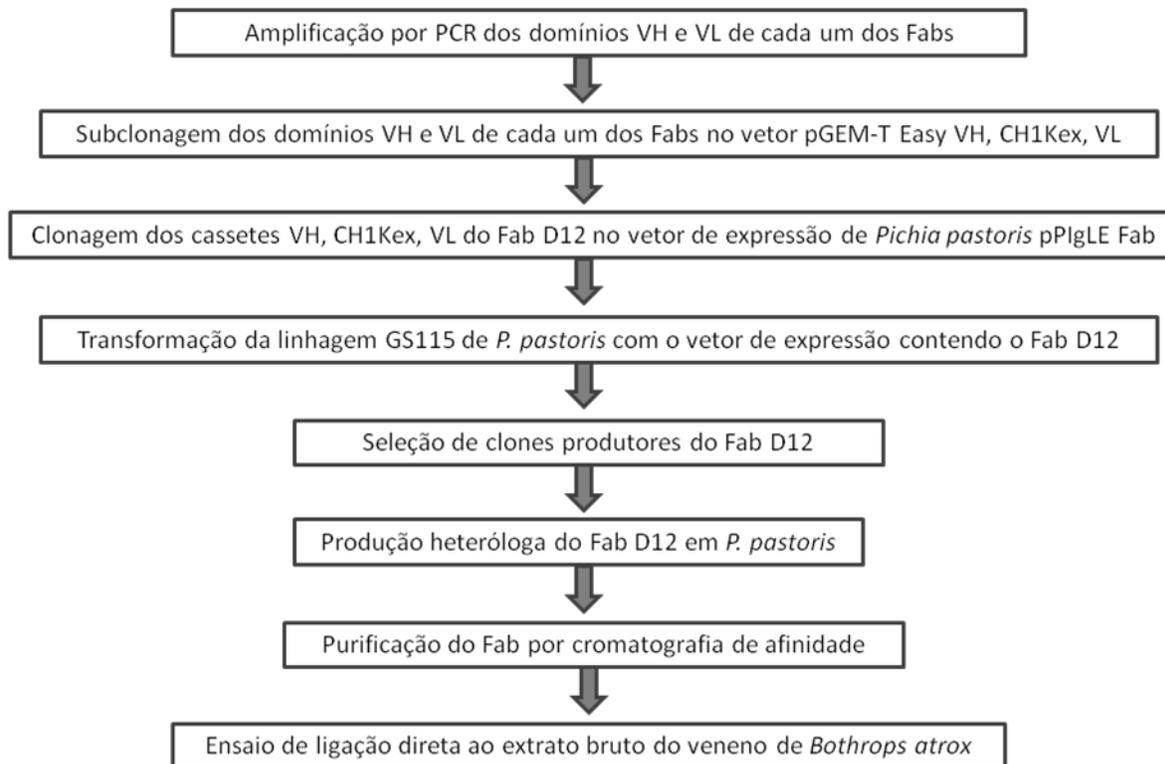
5) Incubar 100  $\mu$ L do anticorpo conjugado à fosfatase alcalina nos poços durante uma hora em temperatura ambiente.

6) Recuperar o anticorpo e proceder a lavagem por duas vezes com PBST 1X.

7) Aplicar 100  $\mu$ L da solução de pNPP em cada poço, cobrir a placa com papel alumínio e incubar por 20 minutos em temperatura ambiente.

8) Ler a absorvância em comprimento de onda de 405 nm.

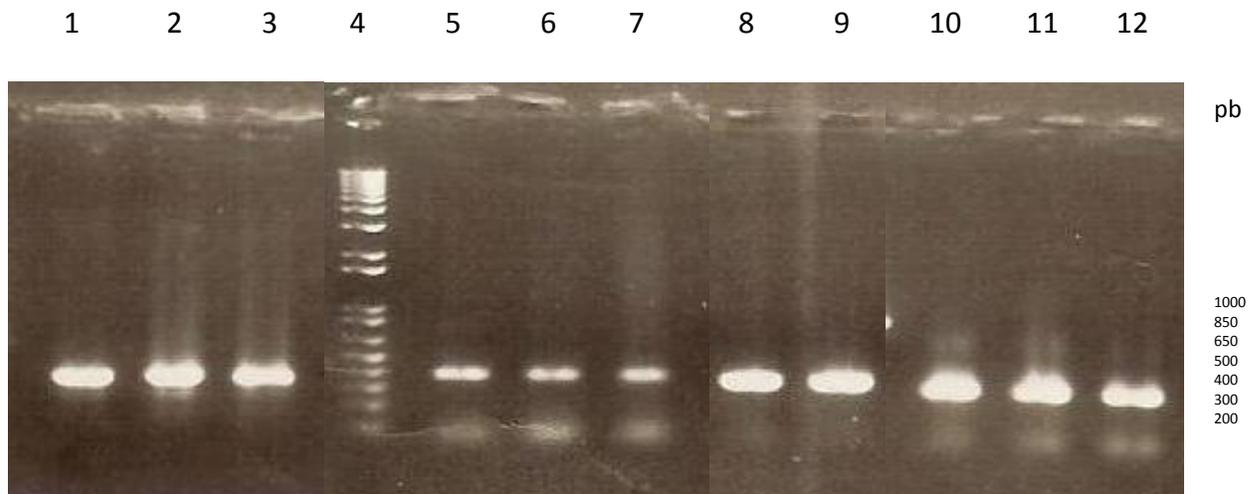
## ABORDAGEM EXPERIMENTAL



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

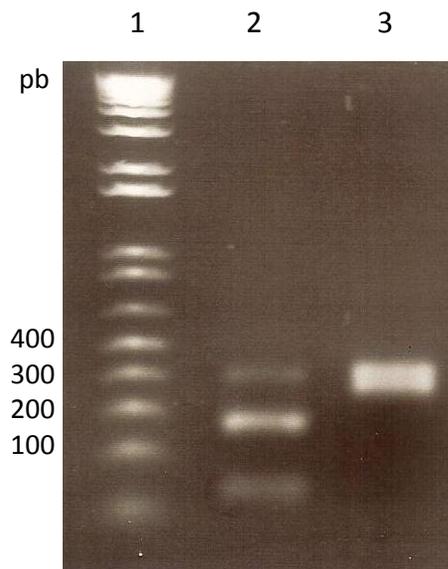
### 1. Amplificação dos domínios VH e VL por PCR

Em trabalho anterior do grupo de Imunologia Molecular da UnB, Mendes (2009) verificou que a sequência dos domínios VL dos Fabs D12 e E11 era exatamente a mesma e obteve como um de seus resultados o vetor pGEM-T Easy VH, CH1, VL E11 - no qual o VH era irrelevante para o presente trabalho - por isso não foi necessário realizar as amplificações desses domínios. A amplificação independente de cada fragmento foi necessária uma vez que no vetor pCOMB 3X da biblioteca de Fabs o cassete estava na ordem invertida, isto é, VLCh seguido de VHCH1. Para tal foi realizada a PCR utilizando-se iniciadores que inseriram sítios de restrição específicos para permitir as clonagens nos vetores utilizados nesse trabalho. Assim sendo, a amplificação dos outros fragmentos VH e VL que compõe cada um dos Fabs (VH D12, VL E11, VH F8 e VL F8) foi a etapa inicial do presente trabalho. Quando analisada em gel de agarose 2%, foi possível visualizar os amplicons correspondentes aos domínios VH e VL (Figura 10).



**Figura 10. Amplificação dos domínios variáveis.** 1 a 3 - VL F8, 4 - 1 kb Plus (Invitrogen), 5 a 7 - VH D12, 8 e 9 - VH E11, 10 a 12 - VH F8. Cada fragmento apresentou o tamanho esperado de aproximadamente 380 pb.

Ao se realizar as digestões desses fragmentos com as enzimas cujos sítios de restrição foram inseridos na etapa inicial detectou-se a presença de uma sequência reconhecida pela enzima Sac I dentro da região codificadora da cadeia do VH do Fab E11 (Figura 11) que impediu a clonagem desse fragmento no vetor pGEM-T Easy. Para solucionar esse problema foi utilizado um iniciador distinto, que inseriu um sítio de Xma I ao invés de Sac I na extremidade 5' do VH E11 durante a fase de amplificação.



**Figura 11. Perfil da digestão do domínio VH E11 com Sac I.** A banda superior (aproximadamente 400 pb) corresponde ao domínio não digerido. As bandas inferiores correspondem aos fragmentos do domínio digerido pela Sac I. 1 – 1 kb Plus (Invitrogen), 2 – VH E11 digerido com Sac I, 3 – VH E11 intacto.

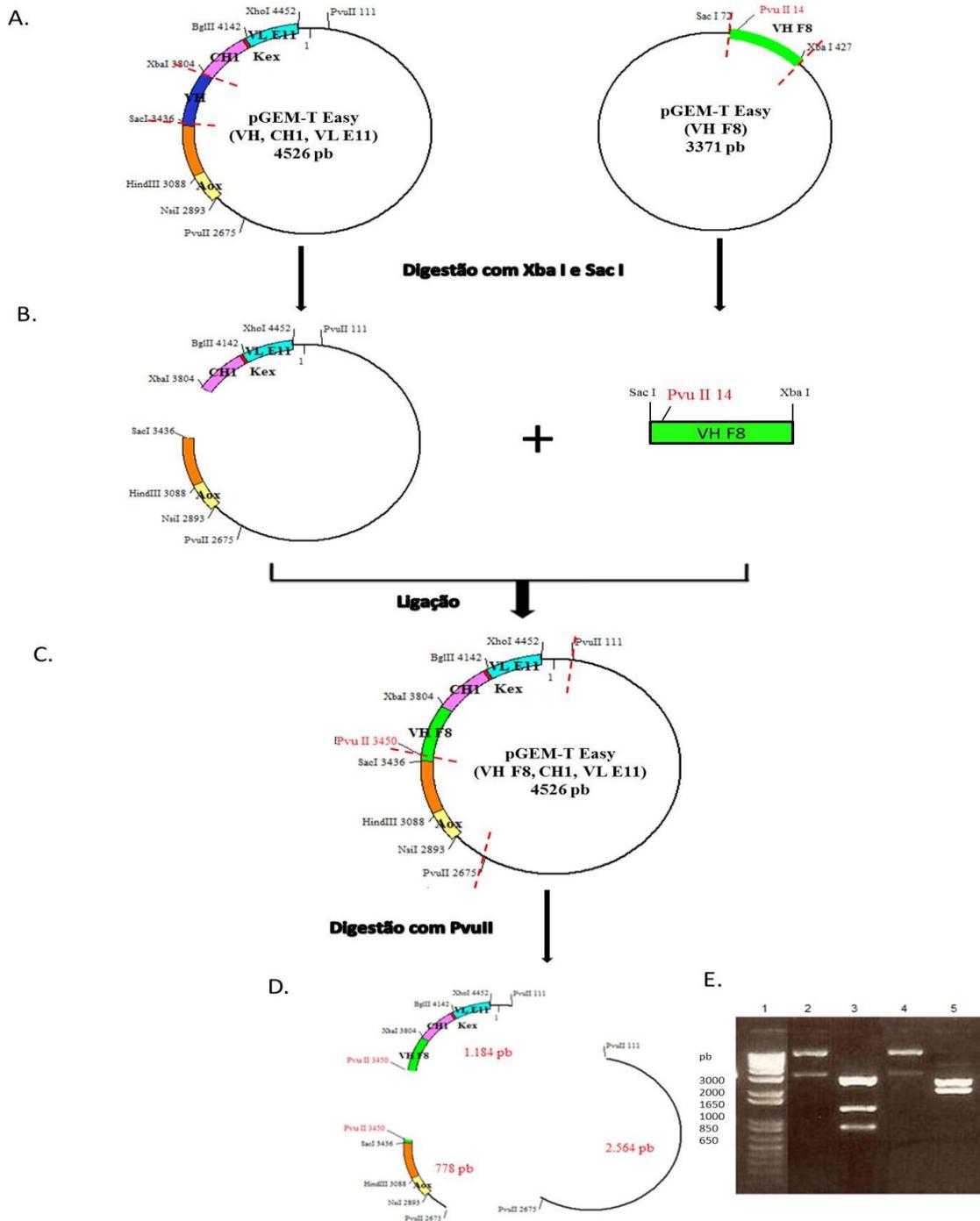
Os fragmentos resultantes das PCRs foram sequenciados, entretanto o VH E11 e o VL F8 não tiveram suas sequências confirmadas.

## 2. Clonagem dos domínios VH e VL no vetor pGEM-T Easy VH, CH1, VL E11.

Para montagem do cassete de expressão de cada Fab foi utilizado o vetor pGEM-T Easy que já continha os domínios VH, CH1 e VL E11 clonados, sendo assim, os genes codificadores dos domínios VH e VL clonados no vetor foram substituídos pelos respectivos amplicons de cada Fab. As clonagens dos genes codificadores de

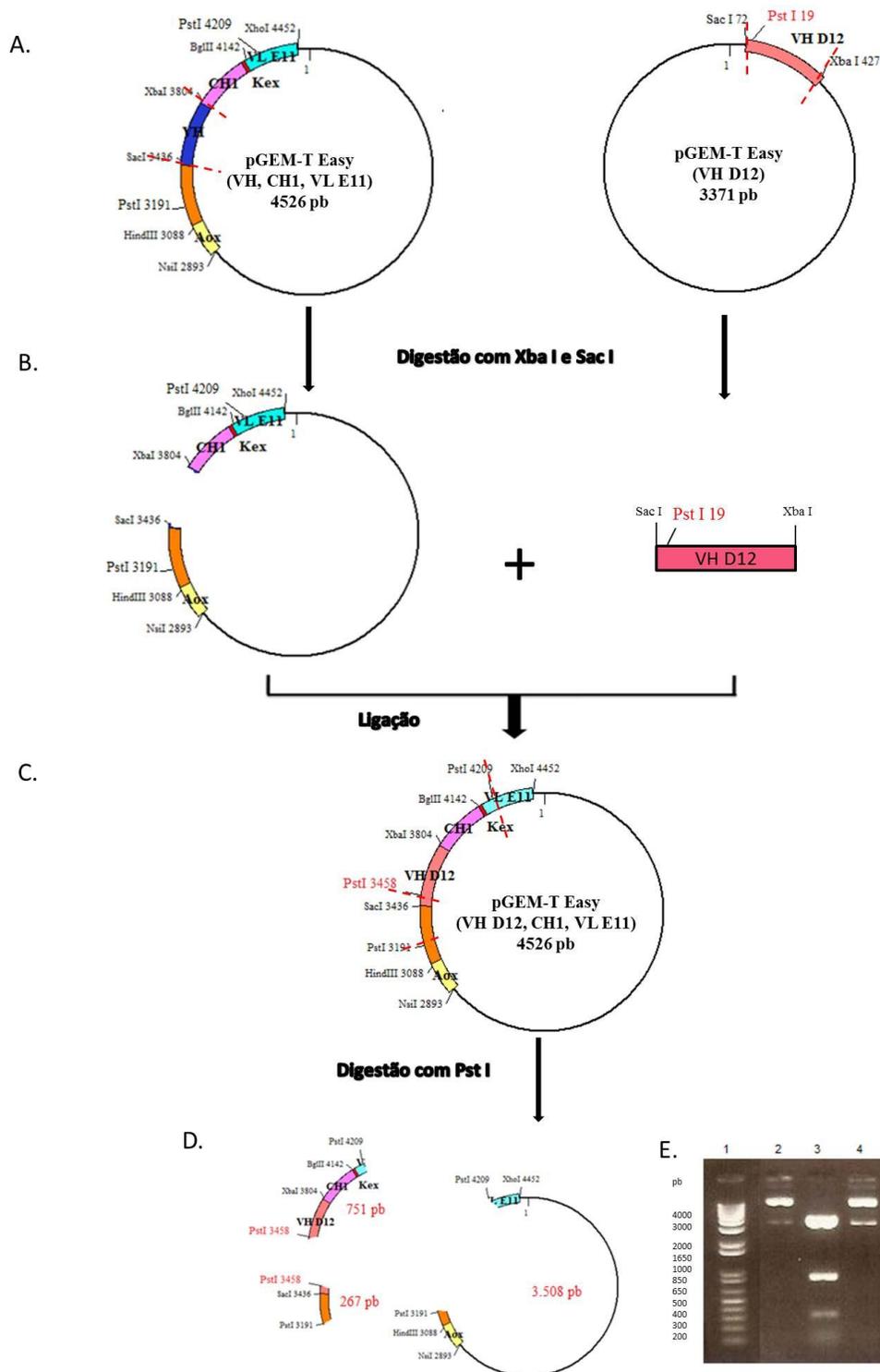
cada domínio foram realizadas individualmente e confirmadas por meio de digestão enzimática. O gene de VH presente no vetor não apresentava sítios de reconhecimento das endonucleases Pst I e Pvu II, ao passo que aquele codificador do domínio VH D12 apresentava um sítio de Pst I e o gene do domínio VH F8 um sítio de Pvu II. O arcabouço do vetor apresentava dois sítios de cada uma das enzimas citadas. A Figura 12 mostra o esquema da clonagem do VH F8 no vetor pGEM-T Easy VH, CH1, VL E11 enquanto a Figura 13 esquematiza a clonagem do VH D12 no mesmo vetor.

As clonagens dos outros genes, VL F8 e VH E11, não foram obtidas. Dessa forma, apenas o cassete de expressão do Fab D12 estava corretamente montado, portanto deu-se prosseguimento ao trabalho com ele.



**Figura 12. Esquema da clonagem do gene codificador do domínio VH F8 no vetor pGEM-T Easy VH, CH1, VL E11.** As linhas vermelhas tracejadas indicam os sítios onde ocorreram as digestões. O sítio de Pvu II marcado em vermelho indica sítio inexistente no vetor original que foi adquirido com a troca do VH pelo VH F8. A) Vetores utilizados na clonagem. B) Vetor e inserto utilizados para ligação. C) Vetor resultante obtido a partir da ligação (pGEM-T Easy VH F8, CH1, VL E11). D) Perfil de bandas obtidas da digestão do vetor pGEM-T Easy VH F8, CH1, VL E11 com a enzima Pvu II. E) Perfil de bandas em gel de agarose que confirma a substituição do VH pelo VH F8 por digestão com a enzima Pvu II. 1 – Marcador 1 Kb Plus; 2 - pGEM-T Easy VH F8, CH1, VL E11 intacto, 3 – pGEM-T Easy VH F8, CH1, VL E11 digerido

com Pvu II, 4 - pGEM-T Easy VH, CH1, VL E11 intacto, 5 – pGEM-T Easy VH, CH1, VL E11 digerido com Pvu II.



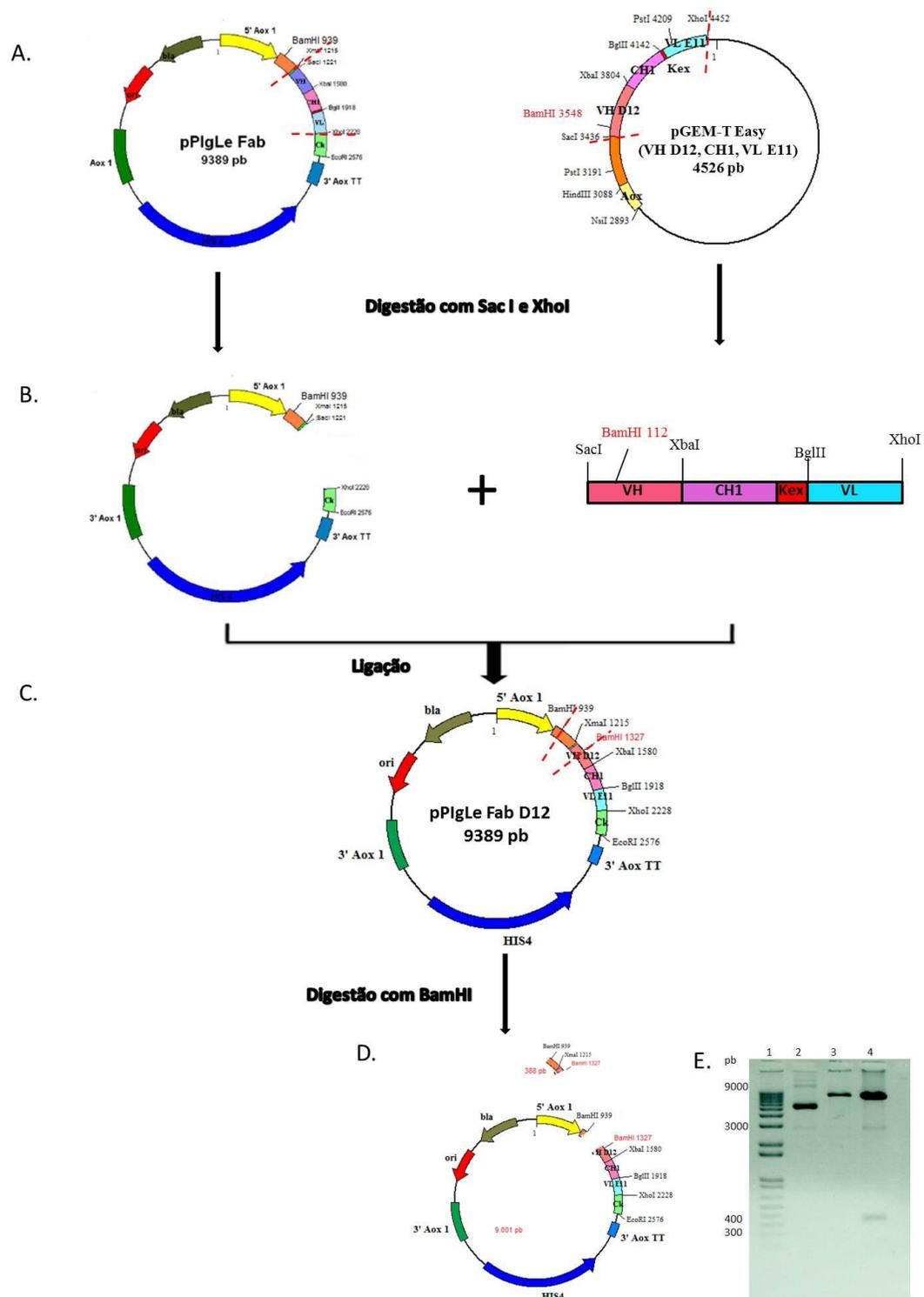
**Figura 13. Esquema da clonagem do gene codificador do domínio VH D12 no vetor pGEM-T Easy VH, CH1, VL E11. As linhas vermelhas tracejadas indicam os sítios onde ocorreram as digestões. O sítio**

de Pst I marcado em vermelho indica sítio inexistente no vetor original que foi adquirido com a troca do VH pelo VH D12. A) Vetores utilizados na clonagem. B) Vetor e inserto utilizados para ligação. C) Vetor resultante obtido a partir da ligação (pGEM-T Easy VH D12, CH1, VL E11). D) Perfil de bandas obtidas da digestão do vetor pGEM-T Easy VH D12, CH1, VL E11 com a enzima Pst I. E) Perfil de bandas em gel de agarose que confirma a substituição do VH pelo VH D12 por digestão com a enzima Pst I. 1 – Marcador 1 Kb Plus; 2 - pGEM-T Easy VH D12, CH1, VL E11 intacto, 3 – pGEM-T Easy VH D12, CH1, VL E11 digerido com Pst I, 4 - pGEM-T Easy VH, CH1, VL E11 intacto, 5 – pGEM-T Easy VH, CH1, VL E11 digerido com Pst I.

### **3. Clonagem do gene do Fab D12 no vetor de expressão de *Pichia pastoris*.**

O vetor de expressão de *Pichia pastoris* pPIgLe Fab desenvolvido por Burtet, em 2007, e adaptado por Simi em 2009, teve os genes codificadores dos domínios VH, CH1 e VL substituídos pelo gene codificador do Fab D12, montado na etapa de clonagem anterior, utilizando-se as enzimas Sac I e Xho I. Esse vetor apresentava apenas um sítio de reconhecimento da endonuclease BamH I, porém o gene do domínio VH D12 também apresentava um desse sítio. Portanto a confirmação da clonagem do gene Fab D12 foi realizada por digestão enzimática utilizando BamH I (Biolabs).

Na Figura 14 está mostrado o esquema da clonagem do VH D12, CH1, VL E11 no vetor pPIgLe Fab. A banda na altura de aproximadamente 3000 pb, presente em todas as amostras mostradas na Figura 9E, corresponde a uma das isoformas do vetor não digerido, ou seja, mesmo nas amostras onde houve digestão, ela não foi completa por isso esse resquício é identificado.

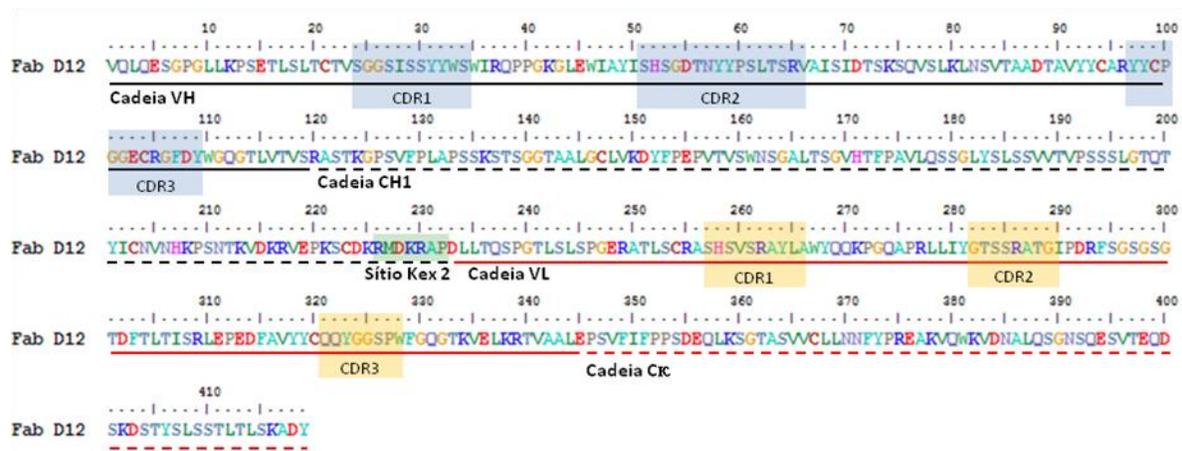


**Figura 14. Esquema da clonagem dos genes codificadores dos domínios VH D12, CH1, VL E11 no vetor pPigLE Fab.** As linhas vermelhas tracejadas indicam os sítios onde ocorreram as digestões. O sítio de BamH I marcado em vermelho indica sítio inexistente no vetor original que foi adquirido com a substituição do VH, CH1, VL pelo cassete VHD12, CH1, VL E11. A) Vetores utilizados na clonagem. B) Vetor e inserto utilizados para ligação. C) Vetor resultante obtido a partir da ligação (pPigLe Fab D12). D)

Perfil de bandas obtidas da digestão do vetor pPIgLe Fab D12 com a enzima BamH I. E) Perfil de bandas em gel de agarose que confirma a substituição do VH, CH1, VL pelo cassete VH D12, CH1, VL E11 por digestão com a enzima BamH I. 1 – Marcador 1 Kb Plus; 2 – pPIgLe Fab intacto, 3 – pPIgLe Fab digerido com BamH I, 4 - pPIgLe Fab D12 digerido com BamH I.

#### 4. Sequenciamento do Fab D12 clonado no vetor pPIgLe Fab

A sequência do Fab D12 foi obtida utilizando-se os oligonucleotídeos de 1 a 11, descritos na Tabela 2, em reações de sequenciamento. Cada um deles anelou em pontos diferentes do gene do Fab (Figura 9) para permitir a sobreposição dos fragmentos sequenciados e a montagem do contig. A sequência contínua resultante está mostrada na Figura 15.



**Figura 15. Sequência proteica do Fab D12.** A linha sólida preta indica a cadeia VH, a linha tracejada preta indica a cadeia CH1, a linha sólida vermelha indica a cadeia VL e a linha tracejada vermelha indica a cadeia Cκ. Os quadros azuis destacam as CDRs da cadeia VH enquanto os quadros alaranjados destacam as CDRs da cadeia VL. O quadro verde mostra a sequência de reconhecimento da endopeptidase Kex2.

A reação de sequenciamento com o oligonucleotídeo 11 não foi bem sucedida e a porção carboxi-terminal do Fab D12 não foi sequenciada. Entretanto esse fato não representou um problema uma vez que nenhuma das etapas de clonagens envolveu esta porção e portanto a cadeia Cκ, assim como a His-tag, presentes no vetor pPIgLe Fab estavam intactas, como comprovado pelo alinhamento mostrado na Figura 16.



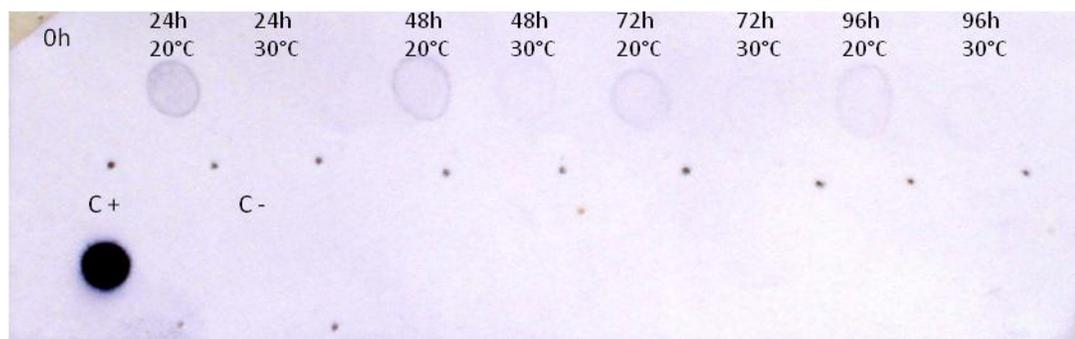
51 – *Pichia pastoris* produtora do Fab anti-CD3 utilizado como controle positivo, 52 – *Pichia pastoris* transformada com o vetor pPIC9 vazio utilizado como controle negativo.

A partir desse resultado foi selecionado um clone produtor, o clone 6, para expressão em frasco sob agitação.

## 6. Expressão do Fab D12

Os experimentos iniciais de expressão do Fab foram realizados baseados nas informações contidas no manual do kit de expressão em *Pichia pastoris* (Invitrogen, 2010). Portanto as condições adotadas, tanto durante a etapa de acúmulo de biomassa quanto na etapa de indução da expressão, foram agitação de 250 rpm e temperatura de 30 °C. Porém, após varias tentativas, não foi possível detectar a produção do Fab.

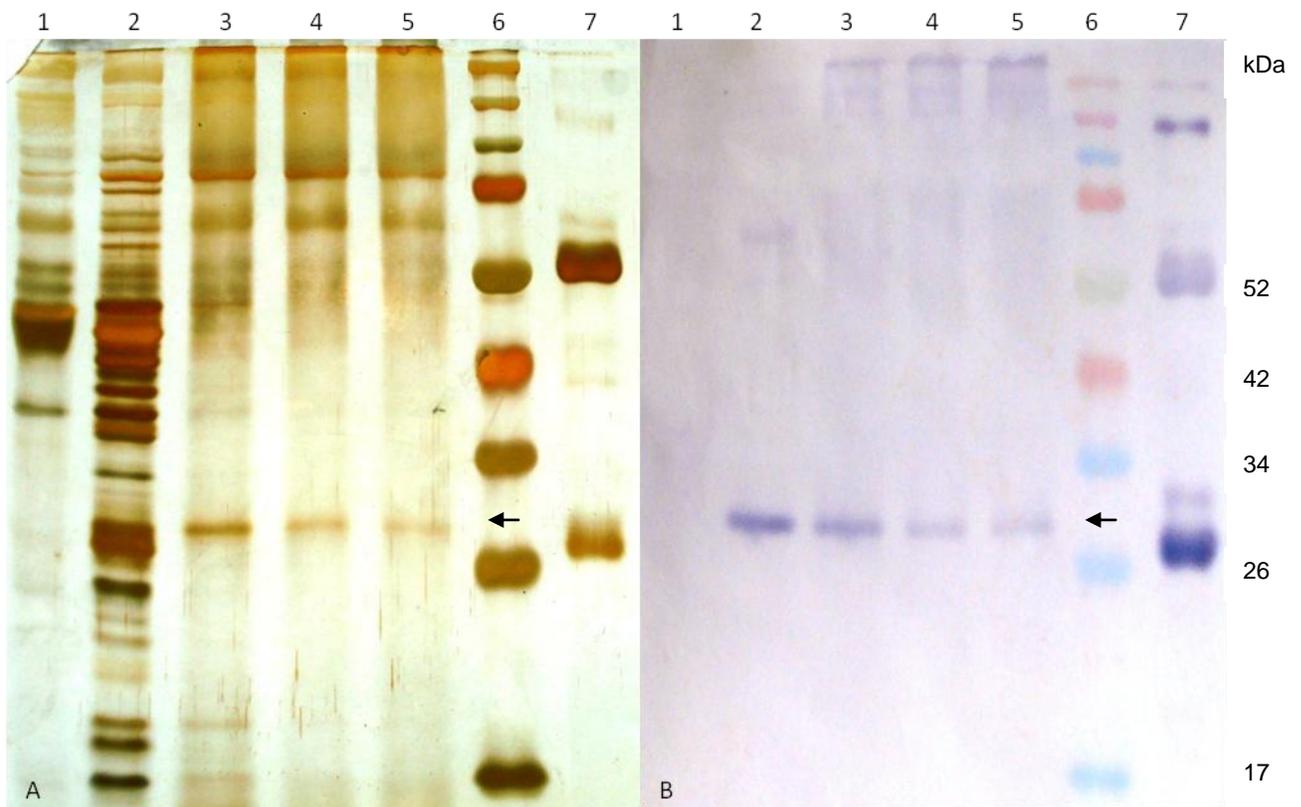
Então, com base na literatura, foram realizados testes para determinar a influência da temperatura na produção da proteína. Verificou-se que quando a indução era feita a 20 °C a expressão do Fab era significativamente melhor do que quando ela era realizada a 30 °C (Figura 18). Também foi possível observar que a produção a 20 °C decaí ao longo do tempo e tem seu pico em 24 horas, ao passo que a indução a 30 °C começa após 48 horas, em baixos níveis, e se mantém estável até 96 horas.



**Figura 18. Efeito da temperatura de indução na produção do Fab ao longo de 96 horas.** Para imunodeteção foi utilizado o anticorpo anti-Ck humano conjugado à enzima fosfatase alcalina. C+ (controle positivo) - IgG humana 100 ng; C- (controle negativo) – Sobrenadante de cultura de GS115 transformada com o vetor pPIC9 vazio.

Para analisar as proteínas presentes no sobrenadante da cultura foi realizada uma eletroforese em gel de SDS-PAGE, corado com prata e posterior *Western Blot*,

para confirmação por imunodeteccção do Fab. A Figura 19A mostra os resultados obtidos pela coloração com prata onde é possível observar que em 24 horas após o início da indução há uma grande variedade de proteínas presente no sobrenadante e a presença do Fab. A partir de 48 horas o perfil de proteínas muda radicalmente, existindo pouca diversidade de proteínas, incluindo o Fab, cuja produção é diminuída ao longo do tempo. Também se observa uma diferença no perfil de proteínas no sobrenadante da cultura antes e depois da indução. O Fab é representado pelas bandas de aproximadamente 27 kDa correspondentes às cadeias leve e pesada reduzidas. Ao se comparar os resultados descritos acima com os obtidos por *Western Blot* (Figura 19B), pode-se confirmar que a maior produção do Fab ocorre nas primeiras 24 horas após o início da indução e decresce gradativamente.



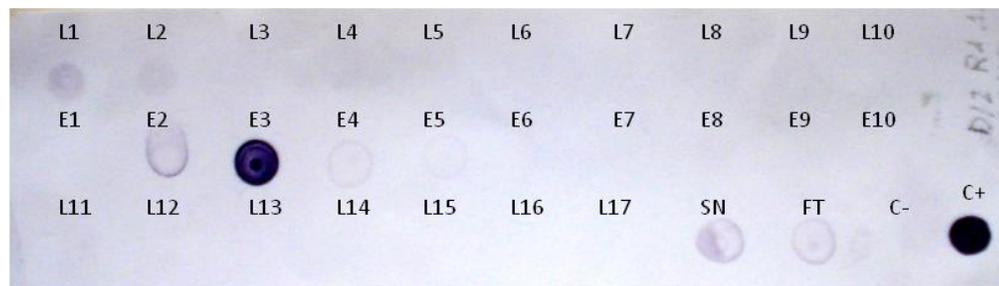
**Figura 19. Expressão do Fab D12 pela linhagem GS115 de *Pichia pastoris*.** A) Coloração com prata. B) *Western Blot* detectado com o anticorpo anti-C $\kappa$  humano conjugado à fosfatase alcalina (Sigma Aldrich). Em cada poço foi aplicado o equivalente a 1 mL do sobrenadante da cultura coletado após diversos tempos de indução a temperatura de 20 °C, após precipitação com TCA. Em ambos os painéis as setas indicam a banda representada pelas cadeias leve e pesada do Fab. 1 – Sobrenadante (S.N.) 0h, 2 – S.N. 24h, 3 – S.N. 48h, 4 – S.N. 72h, 5 – S.N. 96h, 6 – *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Fermentas), 7 – IgG humana 800 ng utilizada como controle positivo.

A amostra de sobrenadante coletada após 24 horas de indução evidencia a presença de diversas bandas além daquelas correspondentes ao Fab e grande parte delas representam as próprias proteínas existentes no meio de cultura. Sendo assim optou-se por realizar 48 horas de indução uma vez que, mesmo com uma produção ligeiramente menor, a etapa de purificação subsequente seria bastante facilitada devido à menor quantidade de contaminantes na amostra.

## 7. Purificação

A purificação do Fab foi realizada por cromatografia de afinidade por meio da coluna *HisTrap FF crude 5 mL* (GE Healthcare). O experimento de purificação inicial também foi baseado nas instruções do fabricante da coluna e o sobrenadante da cultura foi filtrado, para retirada de resquícios celulares, e então diretamente aplicado na coluna para permitir a ligação do Fab ao níquel. Esse procedimento não obteve sucesso pois o Fab não se ligava à coluna e era totalmente recuperado no *flow-through*, fração do sobrenadante após a passagem pela coluna.

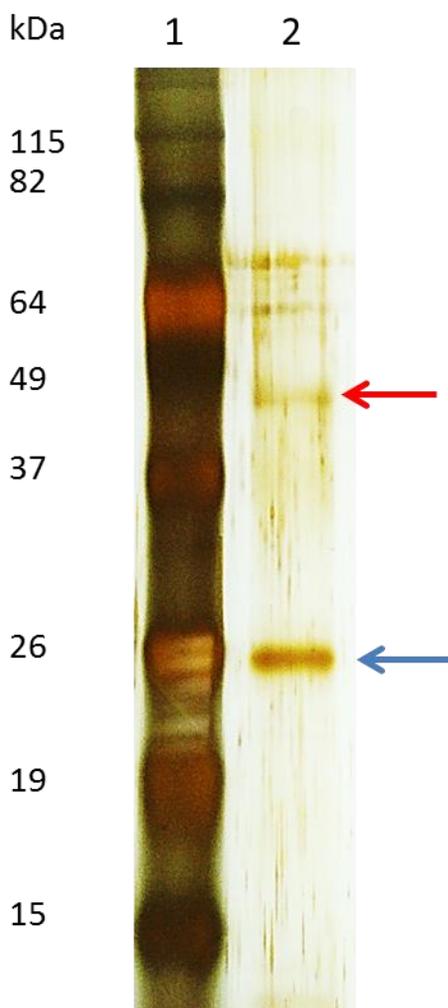
Suspeitou-se então que os sais presentes no sobrenadante estivessem impedindo a interação entre o Fab e o níquel. Para solucionar esse problema foi realizada a concentração e diálise do sobrenadante contra o tampão de ligação da coluna, em uma etapa anterior a purificação. Esse procedimento melhorou muito a ligação da proteína ao níquel, apesar de ainda se verificar uma pequena perda da proteína recombinante nas duas primeiras lavagens, e permitiu que a purificação fosse realizada (Figura 20).



**Figura 20. Purificação do sobrenadante de cultura concentrado e dialisado contra o tampão de ligação da coluna.** L1 a L10 – Lavagens da coluna após a passagem do sobrenadante, E1 a E10 –

Eluições das proteínas ligadas à coluna, L11 a L17 – Lavagens da coluna após as eluições, SN – Sobrenadante da cultura produtora do Fab, FT – *Flow-through*, C- - Sobrenadante de cultura transformada com pPIC9 vazio, C+ - IgG humana 100 ng.

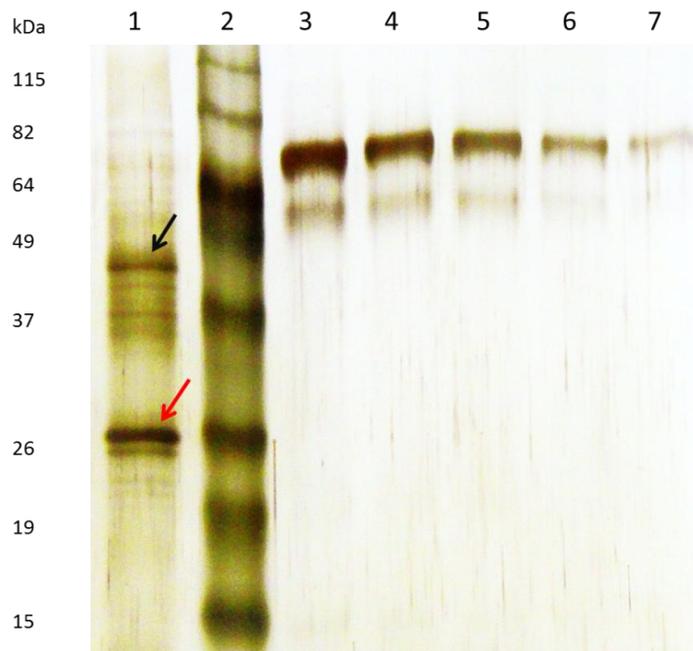
As frações eluídas mais concentradas foram reunidas e fez-se um SDS-PAGE com essa amostra para analisar a sua pureza. A Figura 21 mostra que o grau de pureza foi alto já que apenas as bandas correspondentes ao Fab foram identificadas. As duas bandas que aparecem na altura aproximada de 64 kDa são artefatos decorrentes do TEMED utilizado na confecção do gel.



**Figura 21. Análise do Fab D12 purificado.** 1 – Marcador *Molecular BenchMark Pre-Stained Protein Ladder*; 2 – Frações eluídas mais concentradas reunidas. A seta azul indica as cadeias leve e pesada do Fab reduzidas e a seta vermelha provavelmente indica o dímero formado por elas ou o Fab não processado pela Kex2.

## 8. Quantificação do Fab

Segundo a literatura o nível de produção de proteínas heterólogas em *Pichia pastoris* é bastante variável, desde poucos mg/L até alguns g/L, dependendo principalmente do tipo de proteína a ser expressa. No caso de fragmentos de anticorpos, especificamente Fabs, tem-se uma produção média variando entre 5 e 80 mg/L quando a expressão é realizada em frascos sob agitação e atingindo até 420 mg/L com expressão em fermentadores (Ning *et al*, 2005). Para a quantificação do Fab D12 utilizou-se as frações eluídas na purificação após processo de concentração e diálise contra tampão PBS 1X. Optou-se pelo método comparativo de bandas em gel de poliacrilamida como mostrado na Figura 22.



**Figura 22. Quantificação do Fab D12 pelo método de comparação de bandas com BSA.** 1 – Fab D12 purificado; 2 – Marcador Molecular *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen); 3 – BSA 1000 ng; 4 - BSA 500 ng; 5 – BSA 300 ng; 6 – BSA 200 ng; 7 – BSA 100 ng. A seta vermelha indica as cadeias leve e pesada do Fab D12 e a seta preta provavelmente indica o dímero formado por ambas as cadeias.

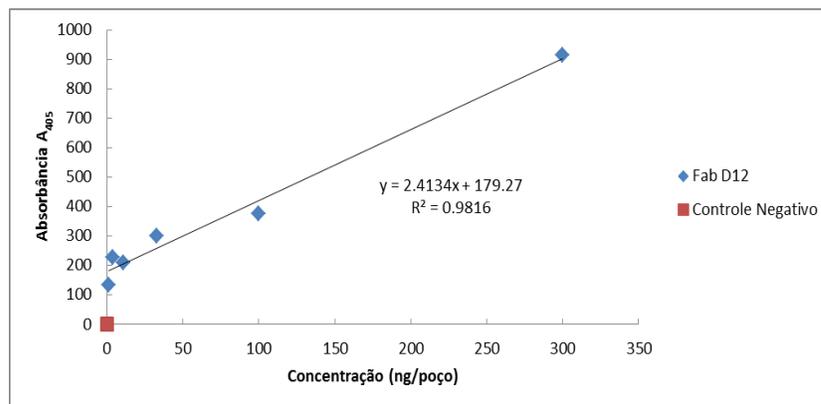
Na coluna 1 da Figura 22 é possível verificar a existência de outras bandas além das correspondentes ao Fab que são, na realidade, decorrentes da degradação da própria proteína de interesse (dados não mostrados), mesmo a amostra tendo sido estocada na geladeira e com inibidores de protease.

Para a quantificação do Fab a Figura 22 foi analisada pelo software ImageJ 1.45s. Esse programa analisa o tamanho e a intensidade de cor das bandas presentes no gel e as compara com padrões determinados de acordo com a necessidade do usuário. Foram utilizadas como padrões diferentes massas conhecidas da proteína BSA (colunas 3 a 7) e a partir de suas bandas foi estimada a massa de Fab D12 correspondente às duas bandas indicadas por setas na Figura 20 em 240 ng totais, correspondendo a 30 ng/ $\mu$ L da amostra.

A produção do Fab D12 atingiu 30 mg/L de proteína pura e foi considerada razoável para a expressão nas condições realizadas: frasco de cultura. Além disso, parte da proteína recombinante foi perdida durante os processos de diálise, concentração e purificação. A produção obtida foi suficiente para realização do teste de ligação.

## 9. Ensaio de ligação direta

O ensaio de ligação direta foi realizado para verificar se o Fab D12 mantinha sua ligação ao peçonha de *Bothrops atrox* que foi imobilizado na placa de microtitulação. A titulação da proteína heteróloga foi realizada com o objetivo de verificar a relação entre a massa de Fab e a intensidade de ligação dele ao peçonha conforme mostrado na Figura 23.



**Figura 23. Ensaio de ligação direta à peçonha de *Bothrops atrox*.** Os losangos azuis representam as absorbâncias, medidas em 405 nm, das amostras de diferentes concentrações do Fab D12. A linha de tendência, a equação da reta e o  $R^2$  dessa relação também estão mostrados. O quadrado vermelho representa a absorbância do Fab Z22 utilizado como controle negativo por se ligar apenas à DNA.

Esse resultado confirma a capacidade do Fab D12 de se ligar em algum ou alguns componentes do peçonha da serpente *B.atrox* embora não permita a identificação desse componente.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho teve como resultado final a expressão e purificação de um Fab humano ligante à peçonha de *Bothrops atrox* utilizando-se como sistema de expressão a levedura *Pichia pastoris*.

Os resultados obtidos com o presente trabalho demonstram que é possível produzir um Fab humano ligante ao peçonha em *P. pastoris* e em quantidades razoáveis. O protocolo de purificação e o tratamento do sobrenadante de cultura antes dele foram bem estabelecidos.

Visando ao desenvolvimento de um soro anti-peçonha de *B. atrox*, constituído de anticorpos humanos, novas tentativas de clonagem dos genes codificadores dos domínios VL F8 e VH E11 devem ser feitas para permitir a produção desses dois Fabs. Dessa maneira os três Fabs, em conjunto, podem constituir uma alternativa menos imunogênica ao tratamento soroterápico administrado às vítimas de acidentes com a espécie.

Tentativa de expressão em fermentador de dois litros foram realizadas entretanto sem sucesso devido a problemas tanto durante a etapa de acúmulo de biomassa quanto durante a indução com metanol. Suspeita-se que tenham ocorrido devido à temperatura e à qualidade do metanol utilizado. Dessa forma sugere-se novas tentativas para alcançar uma maior produção do Fab D12.

Ainda é necessária a realização de testes para identificar o componente do peçonha ao qual o Fab D12 se liga e também para verificar sua capacidade de neutralização dos efeitos tóxicos do peçonha. Sendo assim sugere-se a realização de *Western Blots* da peçonha revelando tanto com o sobrenadante da cultura do Fab D12 quanto com a proteína purificada para identificação do componente reconhecido por ele.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, Brasil (2008).

ALMEIDA, C. M.; KANASHIRO, M. M.; RANGEL FILHO, F. B.; MATA, M. F.; KIPNIS, T. L.; DA SILVA, W. D. **Development of snake antivenom antibodies in chicken and their purification from yolk**. Vet. Re. 143(21):579-584 (1998).

ASSAKURA, M. T., FURTADO, M. S., MALDELBAUM, F. R. **Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrops marajoensis*, *Bothrops moojeni*)**. Comparative Biochemistry and Physiology 102B:727-732 (1992).

AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; DE-SOUZA, M. T. **Técnicas básicas em Biologia Molecular**. Editora UnB, Brasília, Brasil (2003).

BALDO, C., JAMORA, C. YAMANOUYE, N., ZORN, T. M., MOURA-DA-SILVA, A. M. **Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: Tissue distribution and *In Situ* hydrolysis**. PLoS Neglected Tropical Diseases 4(6) e727 (2010).

BARBAS, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. **Phage Display – A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova Iorque, EUA (2001).

BOCHNER, R., STRUCHINER, C. J. **Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão**. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro 19(1):7-16 (2003).

BRAZIL, L. V. **Vital Brazil Mineiro da Campanha – uma genealogia brasileira**. Rio de Janeiro (1996).

BRIGIDO, M. M., MARANHÃO, A. Q. **Bibliotecas combinatórias em Phagos**. Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento 26:44-51 (2002).

BURTET, R. T., SANTOS-SILVA, M. A., BUSS, G. A., MORAES, L. M. P., MARANHÃO, A. Q., BRIGIDO, M. M. **Production of a recombinant Fab in *Pichia pastoris* from a monocistronic expression vector**. J. Biochem. 142(6):665-669 (2007).

BVS/MS. **Normas técnicas de produção e controle de qualidade dos soros antiofídicos, antitóxicos e antirrábico**. Portaria nº 174 de 11 de novembro de 1996, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (1996).

CARDOSO, J. L. C., FAN, H. W., FRANÇA, F. O. S., JORGE, M. T., LEITE, R. P., NISHIOKA, S. A., AVILA, A., SANO-MARTINS, I. S., TOMY, S. C., SANTORO, M. L., CHUDZINSKI, A. M., CASTRO, S. C. B., KAMIGUTI, A. S., KELEN, E. M. A., HIRATA, M. H., MIRANDOLA, R. M. S., THEAKSTON, R. D. G., WARREL, D. A. **Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil**. QJM 86(5):315-325 (1993).

CPPI Centro de Produção e Pesquisas de Imunobiológicos. **Bula do soro antiofídico**. (2008).

CREGG, J. M., HIGGINS, D. R. **Production of foreign proteins in the yeast *Pichia pastoris***. Can. J. Bot. 73:91-97 (1995).

CREGG, J. M., CEREGHINO, J. L., SHI, J., HIGGINS, D. R. **Recombinant protein expression in *Pichia pastoris***. Mol. Biotechnol. 16:23-52 (2000).

DAMASCENO, L. M., PLA, I., CHANG, H. J., COHEN, L., RITTER, G., OLD, L. J., BATT, C. A. **An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris***. Protein Expression and Purification 37(1):18-26 (2004).

DANTAS-BARBOSA, C., BRIGIDO, M. M., MARANHÃO, A. Q. **Construction of a human Fab phage display library from antibody repertoires of osteosarcoma patients**. Genetics and Molecular Research 4(2):126-140 (2005).

DOS-SANTOS, M. C., GONÇALVES, L. R. C., FORTES-DIAS, C. L., CURY, Y., GUTIÉRREZ, J. M., FURTADO, M. F. D. **A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu***. Rev. Inst. Med. Trop. 34(2):77-83 (1992).

FIOCRUZ, INSTITUTO OSWALDO CRUZ. **Animais venenosos e peçonhentos**. Série Prevenindo Intoxicações, p.1-4. São Paulo (2002).

FRY, B. G., WINKEL, K. D., WICKRAMARATNA, J. C., HODGSON, W. C., WÜSTER, W. **Effectiveness snake antivenom: species and regional venom variation and its clinical impact**. Journal Toxicology 22:23-24 (2003).

FUNASA/MS. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2001.

GOLSBY, R. A., KINDT, T. J. E., OSBORNE, B. A., KUBY, J. **Immunology**. 5 ed. Editora W. H. Freeman, Nova Iorque, EUA (2002).

INSTITUTO BUTANTAN disponível no sítio da internet [http://www.butantan.gov.br/home/saude\\_e\\_producao.php](http://www.butantan.gov.br/home/saude_e_producao.php) acessado em 06/04/11.

INVITROGEN. **Manual *Pichia* Expression Kit**. (2010).

JANEWAY, C. A. J., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHOLOMCHIK, M. J. **Imunobiologia – O sistema imune na saúde e na doença**. Editora Artmed, Porto Alegre, Brasil (2008).

LANGE, S., SCHMITT, J., SCHMID, R. D. **High-yield expression of the recombinant, atrazine-specific Fab fragment K411B by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris***. Journal of Immunologic Methods 255:103-114 (2001).

LAROCHE, Y., STORME, V., DE MEUTTER, 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***. Nature Biotechnology 12:1119-1124 (1994).

LEDEBOER, A. M., EDENS, L., MAAT, J., VISSER, C., BOS, J. W., VERRIPS, C. T. **Molecular cloning and characterization of a gene coding for a methanol oxidase in *Hansenula polymorpha***. Nucleic Acid Research 13(9):3063-3082 (1985).

LOMONTE, B., ANGULO, Y. **Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipase A2**. Biochemical Pharmacology 66(10):1993-2000 (2003).

LUCENA, M. N., MENDES, M. M., HOMSI-BRADEBURGO, M. I. **Neutralização dos principais efeitos enzimáticos e biológicos de peçonhas botrópicas brasileiras pelo extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens***. Horizonte Científico (2008).

MAYNARD, J., GEORGIU, G. **Antibody engineering**. Annual Review of Biomedical Engineering 2:339-376 (2000).

MELO, P. A., HOMSI-BRANDEBURGO, M. I., GIGLIO, J. R., SUAREZ-KURTZ, G. **Antagonism of the myotoxic effect of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions.** *Toxicon* 31:285-291 (1993).

MENDES, C. C. C. **Obtenção de Fabs humanos anti-peçonha de *Bothrops atrox* por Phage Display.** Relatório de Iniciação Científica PIBIC (2006).

MUSEU DE CIÊNCIAS NATURAIS/UCS disponível no sítio da internet <http://www.ucs.br/ucs/tplMuseu/museu/serpentario/apresentacao/curiosidades%20acessado%20em%2006/04/11>

NING, D.; JUNJIAN, X.; QING, Z.; SHENG, X.; WENYN, C.; GUIRONG, R.; XUNZHANG, W. **Production of recombinant humanized anti-HBsAg Fab fragment from *Pichia pastoris* by fermentation.** *J Biochem Mol Biol* 38:294-299 (2005).

OLIVEIRA, M. E., MARTINS, M. **When and where to find a pitviper: activity patterns and habitat use of the lancehead, *Bothrops atrox*, in Central Amazonia, Brazil.** *Herpetological Natural History* 8(2):101-110 (2001).

PARDAL, P. P. O., MONTEIRO, M. R. C. C., ARNAUND, R. N., LOPES, F. O. B., ASANO, M. E. **Aspectos epidemiológicos de 465 acidentes ofídicos atendidos no HUIBB – Belém – Pará, no período de 1993-1994.** *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 28:172 (1995).

PARDAL, P. P. O., SOUZA, S. M., MONTEIRO, M. R. C. C., FAN, H. W., CARDOSO, J. L. C., FRANÇA, F. O. S., TOMY, S. C., SANO-MARTINS, I. S., SOUZA-E-SILVA, M. C. C., COLOMBINI, M., KODERA, N. F., MOURA-DA-SILVA, A. M., CARDOSO, D. F., VELARDE, D. T., KAMIGUTI, A. S., THEAKSTON, R. D., WARREL, D. A. **Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north eastern Amazon region of Brazil.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98(1):28-42 (2004).

PIMENTEL, B. M. S. **Humanização e expressão de fragmentos de anticorpos anti-PLA<sub>2</sub> de *Bothrops atrox***. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília (2008).

PROMEGA. **pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems – Technical Manual**. (2010).

ROSTELATO-FERREIRA, S., RODRIGUES-SIMIONI, L., OSHIMA-FRANCO, Y. **Heparin and commercial bothropic antivenom against the paralyzing effect of *Bothrops jararacussu* snake venom**. J. Venom Anim. Toxics incl Trop. Dis 16(1):34-45 (2010).

SÁ NETO, R. P., SANTOS, M. C. **Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos atendidos no Instituto de Medicina Tropical de Manaus (IMTM), 1986-92: estudo retrospectivo**. Rev. Soc. Brasil. Med. Trop. 28 (suppl. 1):171 (1995).

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE – PR disponível no sítio da internet <http://www.sesa.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=1489>

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MS. **Acidentes por animais peçonhentos**. Guia de Vigilância Epidemiológica, Caderno 14 (2008).

SIMI, K. C. R. **Clonagem e expressão de fragmentos de anticorpos (FABs) anti-HIV1 em *Pichia pastoris***. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília (2009).

SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética**. 4 ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil (2008).

TAKAHASHI, K., YUUKI, T., TAKAI, T., RA, C., OKUMURA, K., YOKOTA, T., OKUMURA, Y. **Production of humanized Fab fragment against human high-affinity IgE receptor in *Pichia pastoris***. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64:2138-2144 (2000).

VALE, L. H. F. **Neutralização de atividades biológicas das peçonhas de serpentes botrópicas pelo extrato aquoso e compostos isolados de *Schizolobium parahyba* (FABACEAE)**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (2007).

WU, S.; LETCHWORTH, G. J. **High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol**. Drug Discovery and Genomic Technologies 36(1):152-154 (2004).

WÜSTER, W., THORPE, R. S., PUORTO, G., BBBSP. **Systematics of the *Bothrops atrox* complex (Reptilia: Serpentes: Viperidae) in Brazil: a multivariate analysis**. Herpetologica 52:263-271 (1996).

ZAMUNÉR, S. R., CRUZ-HÖFLING, M. A. D. A., CORRADO, A. P., HYSLOP, S., RODRIGUES-SIMIONI, L. **Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venom and their neutralization by commercial antivenom**. Toxicon. 44:259-271 (2004).