

ESTUDOS ESTRUTURAIS COM MIOTOXINAS
FOSFOLIPASE *A₂-like* ISOLADAS E RECOMBINANTE
DA PEÇONHA DE *Bothrops pauloensis*

Bruna Maria Zamboni

Prof. Tit. Marcos Roberto de Mattos Fontes

Orientador

Prof. Dr. Angelo José Magro

Dr. Fábio Florença Cardoso

Coorientadores

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDOS ESTRUTURAIS COM MIOTOXINAS

FOSFOLIPASE A_2 -like ISOLADAS E RECOMBINANTE

DA PEÇONHA DE *Bothrops pauloensis*

Bruna Maria Zamboni

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Coorientação: Ângelo José Magro e Fábio Florença Cardoso

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, UNESP *Campus* de Botucatu, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas: Estrutura e Função (BEF).

**BOTUCATU-SP
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Zamboni, Bruna Maria.

Estudos estruturais com miotoxinas fosfolipase A2-like isoladas e recombinante da peçonha de *Bothrops pauloensis* / Bruna Maria Zamboni. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Coorientador: Angelo José Magro

Coorientador: Fábio Florença Cardoso

Capes: 20901003

1. Cobra venenosa - Veneno. 2. *Bothrops*. 3. Proteínas recombinantes. 4. Fosfolipases.

Palavras-chave: BnSP-6; BnSP-7; Proteína fosfolipase A2-like; Proteína recombinante; Veneno botrópico.

Agradecimentos

A Deus SU, pelas bênçãos, proteções e orientações todas concedidas para a realização desse trabalho. Aos meus pais Luis e Marizete e meu irmão André Luis, mesmo longe de vocês grande parte da minha vida, nunca deixaram de me dar suporte emocional, educação, carinho e dedicação. Acredito que a criação que vocês me concederam me preparou para situações como esta. Agradeço a minha amada prima Sergianne, seu esposo Cristiano e a Daniele, vocês me amparam como uma filha e sempre me distraem nos momentos mais difíceis que atravessei. Obrigada!

Agradeço ao meu orientador Marcos Roberto de Mattos Fontes pela oportunidade de realizar esse trabalho sob seus cuidados e pela confiança.

Agradeço aos meus co-orientadores Dr. Fábio Florença e Prof. Dr. Angelo Magro, cada um me ensinou algo diferente, saibam que esses ensinamentos me fizeram evoluir profissionalmente e pessoalmente.

A equipe do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural (LBME), agradeço imensamente todo esforço que cada um concedeu ao meu trabalho e a mim. Vocês sempre serão lembrados.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de aperfeiçoamento 88887.338820/2019-00 e ao administrativo do programa de pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada e da UNESP.

A todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram para a minha formação nesse período, meus mais sinceros agradecimentos!

“Avalia-se a inteligência de um indivíduo pela quantidade de incertezas que ele é capaz de suportar”

Immanuel Kant

Sumário

1.1 Acidentes ofídicos.....	2
1.2 Fosfolipases A ₂	4
1.3 Proteínas PLA ₂ -símile (PLA ₂ -like).....	6
1.4 Moléculas inibidoras de PLA ₂ s	7
1.5 <i>Bothrops pauloensis</i> e as miotoxinas BnSP-7 e BnSP-6	8
1.6 Biotecnologia: Expressão heteróloga.....	9
1.7 Levedura <i>Pichia pastoris</i> (<i>Komagataella pastoris</i>) e comparação com outros sistemas de expressão	10
1.8 Expressão de miotoxinas do veneno de serpentes	12
1.9 Objetivos	14
2.1 Estudos biofísicos	16
2.1.1 Obtenção do veneno	16
2.1.2 Purificação da BnSP-7 e BnSP-6	16
2.1.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	17
2.1.4 Processamento de amostras para Espectrometria de Massas (EM)	17
2.1.4.1 Digestão enzimática das proteínas em solução	17
2.1.4.2 Sequenciamento peptídico por EM.....	18
2.1.4.3 Análise dos dados	18
2.1.5 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)	19
2.1.6 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	19
2.1.7 Testes de cristalização e cocrystalização	20
2.1.7.3 Coleta e processamento de dados de difração de raios X	21
2.1.7.4 Refinamento e determinação da estrutura cristalográfica.....	21
2.2 Atividade hemolítica indireta	21
2.3 Clonagem e expressão da BnSP-7 recombinante (rBnSP-7)	22
2.3.1 Obtenção do vetor pPicZαA para expressão em Pichia pastoris	23
2.3.2 Preparo de células competentes de E. coli linhagem DH5α	23
2.3.3 Transformação de células E. coli por choque térmico	24
2.3.4 Extração do DNA plasmidial da bactéria E. coli	24
2.3.5 PCR de colônia dos transformantes de E. coli	24
2.3.6 Análise qualitativa dos produtos de PCR	25
2.3.7 Linearização do plasmídeo pPicZαA-BnSP-7	25
2.3.8 Purificação do plasmídeo pPicZαA-BnSP-7	25

2.3.9 Preparo de células competentes de <i>P. pastoris</i> linhagem KM71H	26
2.3.10 Transformação das células competentes de <i>P. pastoris</i> por eletroporação	26
2.3.11 Extração do DNA plasmidial das colônias transformantes de <i>P. pastoris</i>	27
2.3.12 PCR de colônia dos transformantes de <i>P. pastoris</i>	27
2.4 Testes de viabilidade do antibiótico e das células de <i>P. pastoris</i> KM71H	27
2.4.1 Teste de sensibilidade a antibióticos	27
2.4.1.1 Zeocina TM	27
2.4.1.2 Canamicina	28
2.4.1.3 Cloranfenicol	28
2.4.2 Avaliação de contaminantes nas células originais de <i>P. pastoris</i> KM71H	29
3.1 Purificação da BnSP-7 e BnSP-6	31
3.2 Espectrometria de massas (EM)	33
3.3 Dicroísmo Circular (CD)	34
3.4 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	35
3.5 Testes de cristalização da BnSP-7 e BnSP-6 nativas e cocrystalizadas com ácidos graxos ...	36
3.6 Processamento de dados de difração de raios X, refinamento e resolução da estrutura da BnSP-6	38
3.7 Atividade hemolítica indireta	42
3.8 Transformações de células de <i>E. coli</i> DH5α por choque térmico	43
3.9 Clonagem do vetor pPicZαA-BnSP-7 em <i>E. coli</i> DH5α competentes	43
3.10 Linearização do plasmídeo pPicZαA-BnSP-7	44
3.11 Transformação das células competentes de <i>P. pastoris</i> por eletroporação	45
3.12 PCR de colônia dos transformantes de <i>P. pastoris</i> e testes de viabilidade do antibiótico e das células de <i>P. pastoris</i> KM71H	45
Conclusões e perspectivas futuras	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

Lista de Ilustrações

Capítulo 1

- Figura 1:** Incidência anual do ofidismo nas regiões do Brasil.
- Figura 2:** Classificação e características gerais das miotoxinas dos venenos de serpentes.
- Figura 3:** Mecanismo miotóxico proposto das proteínas PLA₂-like.
- Figura 4:** Representação da estrutura dimérica da BnSP-7 nativa.

Capítulo 2

- Figura 5:** Fluxograma das atividades desenvolvidas com os métodos biofísicos.
- Figura 6:** Estruturas dos ácidos graxos utilizados nos ensaios de cocristalização.
- Figura 7:** Fluxograma das atividades desenvolvidas de clonagem e expressão da rBnSP-7.
- Figura 8:** Vetor de expressão pPicZα (GeneArt®) contendo a sequência referente a BnSP-7.

Capítulo 3

- Figura 9:** Fracionamento do veneno bruto de *B. pauloensis*.
- Figura 10:** Espectro de dicroísmo circular da BnSP-7 e BnSP-6.
- Figura 11:** Evolução dos monocristais de BnSP-6 nativa a 283 K.
- Figura 12:** Crescimento do cristal de BnSP-6 cristalizada na presença de ácido esteárico (BnSP-6/EsA) a 283 K.
- Figura 13:** Cortes da estrutura cristalográfica simulando a posição na nuvem eletrônica dos aminoácidos Gly e Gln.
- Figura 14:** Estrutura cristalográfica da BnSP-7 nativa elucidada em dímero alternativo/compacto.
- Figura 15:** Atividade hemolítica indireta do veneno bruto (VB) de *Bothrops pauloensis* e das frações das toxinas BnSP-7 (N7) e BnSP-6 (N6).
- Figura 16:** Placa dos transformantes de *E. coli* DH5α contendo 25 µg/mL de Zeocina™ e 50 µL de células transformadas.
- Figura 17:** Eletroforese da PCR de colônia dos transformantes de *E. coli* DH5α.
- Figura 18:** Eletroforese da linearização do vetor pPicZαA-BnSP-7 com a enzima *SacI*.
- Figura 19:** Placa dos transformantes em KM71H.
- Figura 20:** Placas contendo células de *E. coli* original em diferentes concentrações do antibiótico Zeocina™.
- Figura 21:** Tubos contendo bactérias em diferentes concentrações de Zeocina™

após 16 horas de incubação a 37 °C.

Figura 22: Tubos contendo bactérias em diferentes concentrações de Canamicina.

Figura 23: Tubos contendo bactérias em diferentes concentrações de Cloranfenicol.

Figura 24: Lâminas de coloração de Gram.

Figura 25: Placa contendo cultura pura de *P. pastoris* KM71H.

Lista de tabelas

Capítulo 2

- Tabela 1:** Sequência de oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho.
- Tabela 2:** Proporções de células/antibiótico para o teste de qualidade da ZeocinaTM.
- Tabela 3:** Concentrações de antibióticos utilizados no teste de viabilidade.

Capítulo 3

- Tabela 4:** Alinhamento da sequência de resíduos de aminoácidos da BnSP-6 e BnSP-7.
- Tabela 5:** Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) da BnSP-7 (3,0 mg/mL em água deionizada).
- Tabela 6:** Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) da BnSP-6 (2,2 mg/mL em água deionizada).
- Tabela 7:** Condições de cristalização avaliadas de melhores resultados obtidos.
- Tabela 8:** Estatísticas de processamento e refinamento dos dados de difração de raios X da BnSP-7.

Lista de siglas e abreviaturas

[θ]	Elipticidade molar residual média;
AOX1	Álcool oxidase 1;
BMGY	Meio Complexo de glicerol (<i>Buffered Glycerol-complex Medium</i>);
BMMY	Meio Complexo de metanol (<i>Buffered Methanol-complex Medium</i>);
BmooPLA ₂	Fosfolipase A ₂ ácida isolada da peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> ;
BnSP-6	Miotoxina “6” fosfolipase A ₂ -like isolada da <i>B. pauloensis</i> ;
BnSP-6/EsA	BnSP-6 complexada com ácido esteárico;
Abs	Absorbância;
ACN	Acetonitrila;
Ambic	Bicarbonato de amônio;
BnSP-7	Miotoxina “7” fosfolipase A ₂ -like isolada da <i>B. pauloensis</i> ;
CD	Dicroísmo circular (<i>Circular Dichroism</i>);
CETA	Centro de Extração de Toxinas Animais;
cPLA ₂	Fosfolipase A ₂ intracelular e citosólica;
c-myc	Epítipo responsável pelo reconhecimento por anticorpos específicos;
DH5 α	Linhagem de <i>Escherichia coli</i> ;
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz;
DO	Densidade óptica;
DO _{600nm}	Densidade óptica mensurada em comprimento de onda de 600 nanômetros;
D _T	Coefficiente de Difusão Translacional;
DTT	Ditiotreitol;
EcoRI	Enzima de restrição isolada a partir de cepas de <i>Escherichia coli</i> ;
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético (<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>);
EM	Espectrometria de Massa;
FAP	Fator de Ativação Plaquetária;
FDR	Falso Discovery;
F _{Calc}	Fatores de estrutura calculados após a realização da substituição molecular;
F _{Obs}	Fatores de estrutura observados a partir da difração de raios X por um monocristal;
HEPES	Ácido 4 - (2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico;
His-Tag	Cauda de poli histidina;
HPLC-RP	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (high

	performance liquid chromatography – reverse phase);
IgG	Imunoglobinas do tipo G;
iPLA ₂	Fosfolipase independente de Ca ²⁺ ;
IR	Índice de Refração;
kb	Kilobase (1000 pares de base);
KM71H	Linhagem de <i>Pichia pastoris</i> ;
LB	Meio Luria-Bertani;
LBME	Laboratório de Biofísica Molecular Estrutural;
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron;
Lys49-PLA ₂ s	Fosfolipases A ₂ -like que possuem um resíduo de lisina na posição 49;
MDiS	Sítio de desestabilização da membrana (<i>Membrane Disruption-Site</i>);
MDoS	Sítio de docagem à membrana (<i>Membrane Docking-Site</i>);
NotI	Enzima de restrição isolada a partir de cepas de <i>Nocardia otitidis</i> ;
OMS	Organização Mundial da Saúde;
ORF	Fase aberta de leitura (<i>open reading frame</i>);
O _γ	Oxigênio gama;
PAF-AH	Fator de ativação plaquetária do tipo acetil-hidrolases;
PBS	Tampão fosfato salino (<i>phosphate-buffered saline</i>);
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>);
PDB ID	Código de três letras que identificam uma estrutura cristalográfica depositada no <i>Protein Data Bank</i> ;
PDB	<i>Protein Data Bank</i> ;
PEG	Poli(etil)enoglicol;
PLA ₂	Fosfolipases A ₂ (Fosfolipases A ₂ (E.C. 3.1.1.4));
pPicZαA	Vetor de expressão em <i>Pichia pastoris</i> com seleção por Zeocina™;
ppm	Porção por milhão;
R _{Cryst}	Valor de discordância entre os valores dos fatores de estrutura calculados (F _{Calc}) e os valores dos fatores de estrutura observados (F _{Obs});
R _{Free}	Valor de discordância entre os valores dos fatores de estrutura calculados (F _{Calc}) e os valores dos fatores de estrutura observados (F _{Obs}) calculado usando um subconjunto de reflexões retiradas aleatoriamente (geralmente em torno de 5%) que não são usadas durante o refinamento da estrutura;
R _h	Raio hidrodinâmico;
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>);

<i>SacI</i>	Enzima de restrição;
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>);
sPLA ₂	Fosfolipase A ₂ secretada ou pancreática;
svPLA ₂	Fosfolipase A ₂ secretada encontrada em venenos de serpentes;
TEMED	Tetrametiletilenodiamina;
TFA	Ácido Trifluoroacético;
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto;
× g	Força centrífuga aplicada “x” vezes maior que a força gravitacional da Terra;
YNB	Meio de base nitrogenada para levedura (<i>Yeast Nitrogen Base</i>);
YPD	Meio contendo extrato de levedura, peptona e dextrose (<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>).

Resumo

A toxicidade do veneno das serpentes do gênero *Bothrops* é resultante da ação integrada de várias toxinas, entre elas as fosfolipases A₂ (PLA₂s). Entre o grupo das PLA₂s, há as PLA₂s ativas enzimaticamente e as PLA₂s desprovidas de atividade enzimática, denominadas proteínas PLA₂-like. Apesar de sua inatividade enzimática, as proteínas PLA₂-like desses venenos possuem potente ação miotóxica local; efeito o qual o soro antiofídico não é capaz de neutralizar efetivamente. Tendo em vista as limitações da soroterapia, é necessário compreender como essas miotoxinas agem localmente. Uma abordagem eficaz é o estudo estrutural-funcional destas toxinas com potenciais inibidores ou ativadores. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo estudar a relação estrutura-função da BnSP-7 e sua isoforma BnSP-6, duas miotoxinas PLA₂-like do veneno de *Bothrops pauloensis*, através de sua interação com ácidos graxos. Deste modo, essas proteínas foram obtidas a partir do veneno bruto de *B. pauloensis* por cromatografia líquida de troca iônica seguida por cromatografia em fase reversa. As frações obtidas foram analisadas por espectrometria de massa para a confirmação de ambas as identidades, no entanto não foi possível identifica-las. Foi observado por técnica de espectroscopia de dicroísmo circular a preservação das estruturas secundárias dessas toxinas (enovelamento referente à PLA₂). Foram obtidos cristais da amostra purificada após 21 dias de incubação a 283 K e por esses dados cristalográficos verificou-se que a amostra possuía a sequência da proteína BnSP-7. Além disso, no intuito de estudar as regiões de importância funcional destas toxinas foi procurada a obtenção da BnSP-7 por expressão heteróloga em sistema eucarioto (*Pichia pastoris*). Não foi possível induzir a levedura a produzir a proteína recombinante, porém há perspectivas quanto ao sucesso da expressão heteróloga. A expressão do modelo molecular da proteína BnSP-7 abrirá caminhos para atestar hipóteses prévias dos domínios estruturais que são responsáveis pela atividade dessas toxinas, assim como os mecanismos de inibição propostos.

Palavras-chave: Proteína recombinante, BnSP-6, BnSP-7, Proteínas fosfolipase A₂-like, Cristalografia, Veneno de serpente, Veneno botrópico.

Abstract

The toxicity of *Bothrops* venom is the result of the integrated action of several toxins, including phospholipases A₂ (PLA₂s). Among the group of PLA₂s, there are the enzymatically active PLA₂s and the PLA₂s devoid of enzymatic activity, called PLA₂-like proteins. Despite their enzymatic inactivity, the PLA₂-like proteins of these poisons have a potent local myotoxic action; an effect that the anti-oxide serum is not able to neutralize effectively. Given the limitations of serotherapy, it is necessary to understand how these myotoxins act locally. An effective approach is the structural-functional study of these toxins with potential inhibitors or activators. Therefore, the present study aims to study the structure-function relationship of BnSP-7 and its BnSP-6 isoform, two PLA₂-like myotoxins from *Bothrops pauloensis* venom, through their interaction with fatty acids. Thus, these proteins were obtained from the raw venom of *B. pauloensis* by ion exchange liquid chromatography followed by reverse phase chromatography. The fractions obtained were analyzed by mass spectrometry to confirm both identities, but it was not possible to identify them. The preservation of secondary structures of these toxins (entanglement related to PLA₂) was observed by circular dichroism spectroscopy technique. Crystals were obtained from the purified sample after 21 days of incubation at 283 K and by these crystallographic data it was found that the sample had the BnSP-7 protein sequence. In addition, in order to study the regions of functional importance of these toxins, BnSP-7 was obtained by heterologous expression in a Eucharistic system (*Pichia pastoris*). It was not possible to induce yeast to produce recombinant protein, but there are prospects for the success of heterologous expression. The expression of the molecular model of the protein BnSP-7 will open ways to attest previous hypotheses of the structural domains that are responsible for the activity of these toxins, as well as the proposed inhibition mechanisms.

Keywords: Recombinant protein, BnSP-6, BnSP-7, Phospholipase A₂-like proteins, Crystallography, Snake venom, Bothropic venom.

Capítulo 1:

Introdução e objetivo

1.1 Acidentes ofídicos

A ocorrência de acidentes ofídicos em humanos é resultado de um comportamento de defesa quando as serpentes se sentem em perigo, provocando perfuração ou arranhaduras vindas de envenenamento ou não, e dependendo da espécie da serpente, o caso se agrava a uma dilaceração tecidual (SANDRIN *et al.*, 2005). Os acidentes ofídicos são considerados um sério problema de saúde pública, principalmente em países de clima tropical e subtropical. As estimativas anuais chegam a 150 mil óbitos em todo o mundo e esse número pode ser ainda maior devido às subnotificações nas áreas negligenciadas da América Latina, África e Ásia (KASTURIRATNE *et al.*, 2008; PINHO; PEREIRA, 2001). Normalmente, a falta de notificação em alguns casos deve-se a demora no acesso aos serviços de saúde ou mesmo à ausência desses serviços. Outro agravante refere-se ao modo como partes dessas vítimas costumam realizar o tratamento, optando por métodos de prática tradicional (BOCHNER; STRUCHINER, 2003).

No Brasil, os acidentes ocasionados por animais peçonhentos ocupam a segunda posição no ranque de envenenamento, logo após os casos de intoxicação por medicamentos (Fundação Oswaldo Cruz, 2013). De acordo com o último boletim publicado pelo Ministério da Saúde, o ano de 2017 apresentou-se com o maior número (em toda a série histórica avaliada) de acidentes no trabalho ocasionados por animais peçonhentos, sendo as serpentes a causa da maior parte desses acidentes (n = 45.763), seguidas por escorpiões (n = 22.596) (BRASIL, 2019).

A situação do cenário brasileiro referente aos casos de envenenamento por serpentes é regularmente fornecida pelo Ministério da Saúde, que reportou cerca de 443 mil casos de acidentes ocorridos entre os anos de 2000 e 2018, com uma taxa de incidência de 13,8 acidentes por 100.000 habitantes e mais de 1.800 casos evoluindo a óbito (BRASIL, 2019). Assim, estima-se que ocorram anualmente cerca de 20.000 casos de envenenamento por serpentes no Brasil, colocando o país em primeiro lugar no ranque da América do Sul (BRASIL, 2019). A região Norte do Brasil é caracterizada por apresentar a maior taxa de incidência anual desses acidentes (52,4 casos/100.000 habitantes) e o Sul como a região brasileira que apresenta o menor índice (7,6 acidentes/100.000 habitantes) (Figura 1). No entanto, a região Nordeste apresentou em 2018 o maior número de óbitos (42), seguida da região Norte (26), Sudeste (21), Centro-oeste (11) e Sul (6) (BRASIL, 2019). Além disso, os dados epidemiológicos permitem indicar o clima como um fator importante da ocorrência de acidentes ofídicos, pois os meses mais quentes e chuvosos do ano concentram o maior número de registros de acidentes (BOCHNER; STRUCHINER, 2002). Outro fator agravante refere-se ao aumento do trabalho no campo para desempenho de atividades agropecuárias, principalmente entre os trabalhadores do sexo masculino de faixa etária entre 10 e 49 anos (WARRELL, 2012). Tais dados epidemiológicos não sofreram alterações nos últimos 100 anos (BOCHNER; STRUCHINER, 2002).



Figura 1. Incidência anual do ofidismo nas regiões do Brasil. Adaptação de Ministério da Saúde (2019).

No final do século XIX, a primeira descrição de uma possível terapia para envenenamento por mordidas de serpentes foi relatada por Vital Brazil. Este, após ler um relatório de soro para serpente do gênero *Naja*, resolveu comprar soros monovalentes para venenos de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* (denominadas popularmente como jararacas e cascavéis, respectivamente), as principais serpentes de importância médica no Brasil (LUNA *et al.*, 2011). Como respaldo aos resultados dos relatórios de Vital Brazil (1865-1950), no final da década de 1980 ocorreu a primeira demonstração da especificidade do soro antiofídico, possibilitando o desenvolvimento do primeiro soro polivalente para uso terapêutico (HAWDOOD, 1992). Desde o século XIX até os dias atuais, se imunizavam cavalos com venenos de *Bothrops* e *Crotalus* e observavam as diferentes reações para obtenção do soro antiofídico, como descrito em ofícios de Vital Brazil (PIEADADE *et al.*, 2015; GUTIÉRREZ *et al.*, 2006). Essa terapia desenvolvida há mais de um século por Vital Brazil ainda permanece como o único tratamento disponível para os envenenamentos ofídicos (CARDOSO *et al.*, 2003). E apesar de sua eficácia na neutralização dos efeitos sistêmicos do envenenamento, o soro não apresenta a mesma eficiência contra os efeitos locais. A ineficácia do tratamento não é decorrente da falta das imunoglobulinas (IgG) no soro antiofídico, mas é consequente do acelerado desenvolvimento dos sintomas no local, causando danos teciduais irreversíveis (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003). Deste modo, se faz necessário uma maior compreensão da ação de alguns componentes existentes nas peçonhas, principalmente aqueles envolvidos nos sintomas locais.

1.2 Fosfolipases A₂

A mionecrose, corresponde a um dos mais proeminentes efeitos locais do envenenamento ofídico e pode ser promovida diretamente por proteínas miotóxicas (LOMONTE *et al.*, 2003). Tais proteínas denominadas como miotoxinas podem ser subdivididas em três grupos principais, como ilustrado abaixo (Figura 2).

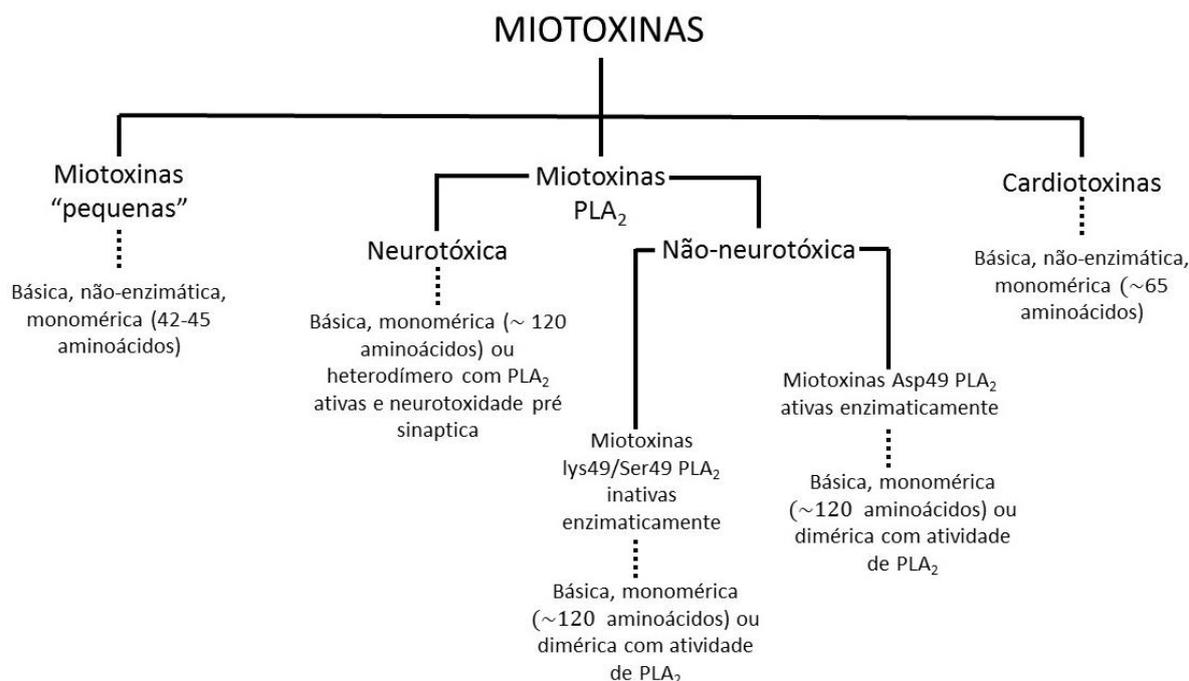


Figura 2. Classificação e características gerais das miotoxinas dos venenos de serpentes. Lys49, Ser49 e Asp49 referem-se aos resíduos de aminoácidos de lisina, serina e ácido aspártico na posição 49 (RENETSEDER *et al.*, 1985) de sua respectiva fosfolipase A₂ (PLA₂) miotóxica. Adaptação de LOMONTE *et al.* (2003).

Nessa classificação, o grupo das “miotoxinas pequenas” compreende toxinas de baixo tamanho molecular (cerca de 4.000 Da), constituídas por 42 a 45 resíduos de aminoácidos com homologias sequenciais e mantidas por três pontes dissulfeto (LEITE, 2004). O grupo das fosfolipases A₂ (PLA₂s) miotóxicas representa o grupo mais diverso e com outras subdivisões, conforme a presença ou ausência de atividade neurotóxica e/ou enzimática (LOMONTE *et al.*, 2003). Por fim, o grupo das cardiotoxinas compreende as miotoxinas de massa molecular entre 6.000 a 7.000 Daltons, constituídas por cerca de 65 resíduos de aminoácidos e mantidas por 4 pontes dissulfeto (LEITE, 2004). Assim, entre esses grupos se evidenciam as PLA₂, as quais estão relacionadas na interferência de processos fisiológicos das vítimas do envenenamento, desencadeando efeitos farmacológicos e fisiopatológicos (LOMONTE *et al.*, 2003). Tais efeitos são caracterizados principalmente pela mionecrose de tecidos moles e no desenvolvimento da síndrome compartimental nos casos mais graves (GUTIÉRREZ; LOMONTE 1995). Deste modo, há perda funcional do membro afligido e possível necessidade de amputação,

corroborando a ineficiência do soro antiofídico ao efeito local do envenenamento (OTERO *et al.*, 2002).

As PLA₂s (E.C. 3.1.1.4) são enzimas lipolíticas que hidrolisam particularmente a ligação acil-éster, na posição *sn*-2 dos glicerofosfolipídeos, liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos (DENNIS *et al.*, 2011). Os produtos gerados da catálise dessas enzimas correspondem a precursores de moléculas de sinalização, que exercem uma gama de funções biológicas (SCHALOSKE; DENNIS, 2006). Os lisofosfolipídeos liberados estão relacionados a processos de sinalização da célula e em alterações no citoesqueleto, promovendo a remodelagem dos fosfolipídeos de membrana, atuando também como precursores de mediadores lipídicos em processos inflamatórios e FAP (fator de ativação plaquetária) (PRESCOTT *et al.*, 2000; KUDO; MURAKAMI, 2002). E os ácidos graxos, especialmente o ácido araquidônico, desempenham um importante papel como precursores na conversão de eicosanóides, os quais possuem uma ampla variedade de funções na sobrevivência celular (especialmente na inflamação, imunidade e como mensageiros do sistema nervoso central) (TSUBOI *et al.*, 2002).

Atualmente, a superfamília das PLA₂s está dividida em 16 grupos (DENNIS *et al.*, 2011), os quais estão distribuídos em seis categorias classificadas de acordo com suas características, tais como mecanismo catalítico, propriedades funcionais e estruturais (SCHALOSKE; DENNIS, 2006; DENNIS *et al.*, 2011). Assim, esses 16 grupos foram devidamente distribuídos entre (I) as PLA₂s de baixa massa molecular e extracelulares, denominadas como secretadas ou pancreáticas (sPLA₂), (II) as PLA₂ de alto peso molecular, intracelulares e citosólicas (cPLA₂), (III) as PLA₂ lipossomais, (IV) as PLA₂ independentes de Ca²⁺ (iPLA₂), (V) as acetil-hidrolases de fator de ativação plaquetária (PAF-AH) e (VI) as PLA₂ específicas de tecido adiposo (DENNIS *et al.*, 2011).

As PLA₂s secretadas (sPLA₂) são um grupo de enzimas com massa molecular de aproximadamente 14-18 kDa, apresentando de 6 a 8 ligações dissulfeto, um resíduo de histidina em seu sítio ativo próximo de um conservado resíduo de ácido aspártico e a necessidade do íon Ca²⁺ para realizar a catálise (SCHALOSKE; DENNIS, 2006; DENNIS *et al.*, 2011). As PLA₂s do veneno de serpentes são classificadas como sPLA₂, dos grupos I e II, os quais são constituídos respectivamente pelas PLA₂s dos venenos de serpentes elapídeas e das serpentes viperídeas (II) (HENRIKSON *et al.*, 1977; BURKE; DENNIS, 2009). Essa classificação foi dada de acordo com o grau de homologia das estruturas, das posições das ligações dissulfeto e dos *loops* (SCHALOSKE; DENNIS, 2006). Deste modo, as PLA₂s dos venenos das serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* estão relacionadas ao grupo II, especificamente no subgrupo IIA (SIX; DENNIS, 2000; SCHALOSKE; DENNIS, 2006; BURKE; DENNIS, 2009).

1.3 Proteínas PLA₂-símile (PLA₂-like)

Em 1984, um estudo dos venenos de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* e *Bothrops atrox*, identificou os primeiros exemplares de um grupo de proteínas estruturalmente semelhantes às PLA₂s (MARAGONORE *et al.*, 1984). Essas proteínas apresentaram algumas alterações como a substituição do resíduo de ácido aspártico na posição 49 (Asp49) pelo resíduo de lisina (Lys) (MARAGONORE *et al.*, 1984). Essas proteínas são desprovidas de atividade catalítica por sua incapacidade de coordenação do íon cálcio, a qual é devida às mutações nos resíduos de tirosina (Tyr28) e de ácido aspártico (Asp49) (FERNANDES *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2014). As características decorrentes dessas mutações fazem com que essas toxinas sejam distintas das PLA₂s, sendo então denominadas como proteínas PLA₂ homólogas (ARNI; WARD, 1996) depois recentemente reclassificadas como proteínas PLA₂-like (FERNANDES *et al.*, 2014).

Apesar da ausência de atividade enzimática das PLA₂-like, essas proteínas mantêm a capacidade de comprometer a integridade de membranas biológicas (eucarióticas e procarióticas) e artificiais (LOMONTE *et al.*, 2003). E assim, tais toxinas são capazes de proporcionar diversos efeitos tóxicos *in vitro* e *in vivo* (LOMONTE *et al.*, 2003). Contudo, os exatos mecanismos pelos quais este mecanismo não-catalítico ocorre não estão totalmente elucidados. Pela análise extensiva dos dados estruturais e funcionais de diversas proteínas PLA₂-like de veneno de serpentes viperídeas, recentemente foi proposto (e já complementado) o mecanismo de ação mais detalhado até então dessas proteínas (Figura 3). Assume-se uma considerável importância da conformação dimérica das proteínas PLA₂-like e de três regiões específicas: (I) o canal hidrofóbico; (II) o sítio catiônico de ancoragem à membrana (MDoS), o qual é formado pelos resíduos catiônicos expostos (tais como Lys115, Arg118, Lys20, Lys80, Lys122 e Lys127); e (III) o sítio hidrofóbico de desestabilização da membrana (MDiS), constituído pelos resíduos hidrofóbicos Leu121 e Phe124 (FERNANDES *et al.*, 2014). Deste modo, essas toxinas em seu estado inativo são “alostericamente” ativadas pela entrada de uma molécula de ácido graxo no canal hidrofóbico de cada monômero. A estabilização da conformação ativa dessas toxinas promove o alinhamento dos resíduos catiônicos do MDoS de ambos os monômeros, aumentando a eficiência de interação com o grupo fosfatidil dos lipídios da membrana. Assim, os resíduos hidrofóbicos do MDiS têm a possibilidade de penetração na camada lipídica da membrana e promover consequentemente sua desestabilização (FERNANDES *et al.*, 2013, FERNANDES *et al.*, 2014; BORGES *et al.*, 2017).

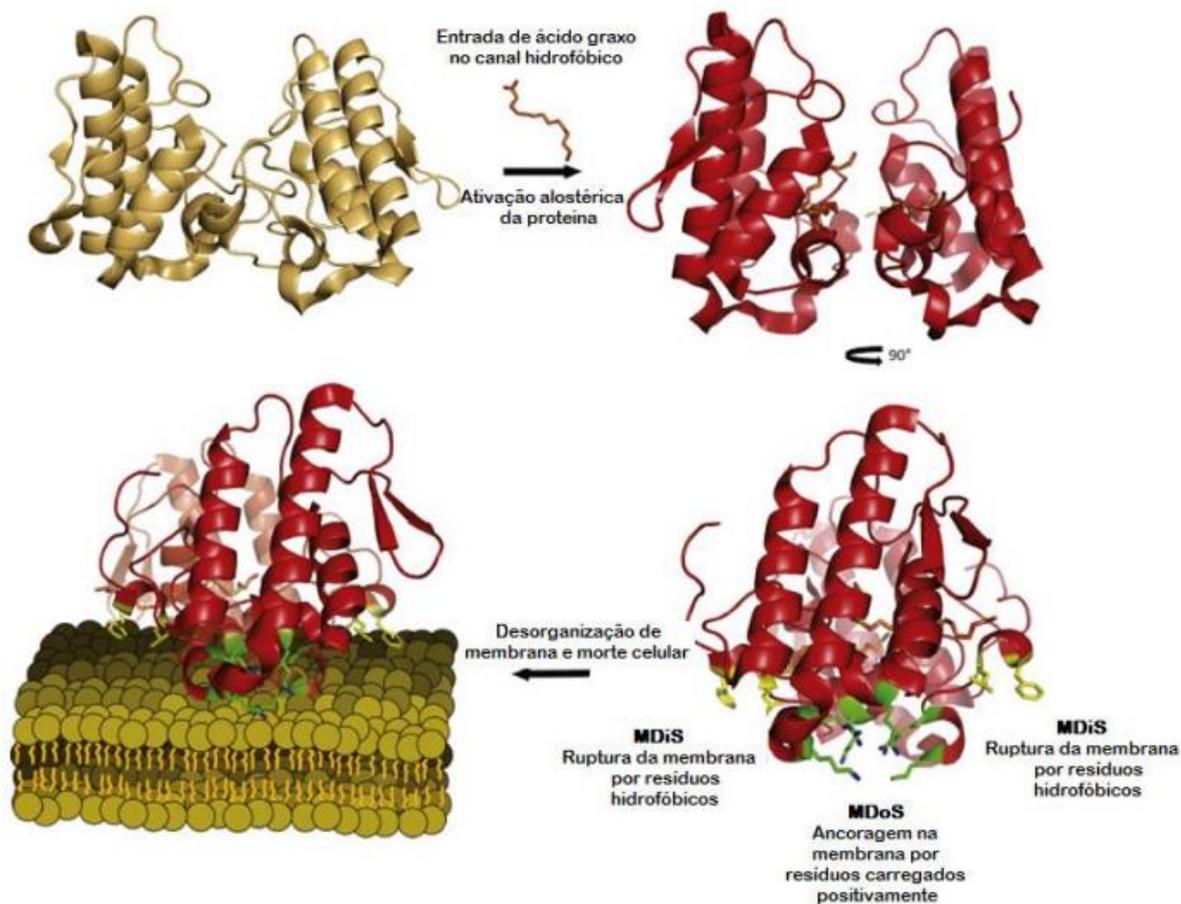


Figura 3. Mecanismo miotóxico proposto das proteínas *PLA₂-like*. A entrada do ácido graxo no canal hidrofóbico da proteína leva a uma ativação “alostérica” da proteína pela reorientação do dímero. Na forma ativa, o MDoS e MDiS ficam alinhados no mesmo plano, expostos ao solvente. A região MDoS estabiliza a proteína na membrana pela interação entre resíduos carregados e a porção hidrofílica do fosfolipídio. Em seguida, a região MDiS desestabiliza a membrana pela inserção de resíduos hidrofóbicos, levando a morte celular. Adaptado de FERNANDES *et al.* (2014).

1.4 Moléculas inibidoras de PLA₂s

Devido a ineficiência do soro antiofídico contra os efeitos locais do envenenamento (WARRELL, 1992), bem como sua escassez em regiões negligenciadas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2010; WARRELL *et al.*, 2010), são buscadas fontes alternativas ao tratamento convencional. Assim, diversas espécies vegetais medicinais apresentam uma grande fonte de compostos bioativos que podem auxiliar diretamente contra os efeitos do envenenamento, ou indiretamente, como complemento à soroterapia antiofídica (SOARES *et al.*, 2005; GUIMARÃES *et al.*, 2014). Deste modo, estudos abordando a interação das proteínas *PLA₂-like* com biomoléculas inibidoras de sua atividade podem levar à melhor compreensão sobre o mecanismo de ação destas proteínas. Nesse sentido, diversos trabalhos foram realizados com tal objetivo sob diferentes abordagens estruturais e funcionais destas toxinas (TICLI *et al.*, 2005; DOS SANTOS *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2015; SALVADOR *et al.*, 2015; BORGES *et al.*, 2017;

CARDOSO *et al.*, 2018; SALVADOR *et al.*, 2019; CARDOSO *et al.*, 2020). Estes estudos estruturais e funcionais mostraram o potencial dos ácidos rosmarínico, cafeico, aristolóquico, chicórico e caftárico, da suramina e de íons Zn^{2+} em inibir as proteínas PLA₂-like.

1.5 *Bothrops pauloensis* e as miotoxinas BnSP-7 e BnSP-6

Aproximadamente 13 mil espécies de serpentes existem no mundo, com 386 espécies catalogadas no Brasil dentre as quais 60 são consideradas peçonhentas (BRASIL, 2019). Todavia, apenas espécies de 3 famílias são de interesse médico no Brasil, sendo elas: *Viperidae* (pelas serpentes do gênero *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Lachesis* e *Crotalus*), *Elapidae* (pelas serpentes do gênero *Micrurus* e *Leptomicrurus*) e *Dipsadidae* (pelas serpentes do gênero *Boiruna* e *Philodryas*) (FERNANDES *et al.*, 2008; SANDRIN *et al.*, 2005). Entre tais gêneros, as serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* são as responsáveis pelos acidentes com envenenamentos (BRASIL, 2019). O domínio das serpentes do gênero *Bothrops* (popularmente conhecidas como jararacas) abrange toda a América Latina, sendo responsáveis por aproximadamente 85% dos casos dos acidentes ofídicos (BOCHNER; STRUCHINER, 2003; RIBEIRO; JORGE 1997).

A serpente *Bothrops neuwiedi pauloensis* (RODRIGUES *et al.*, 1998) foi reclassificada em 2009 como *Bothropoides pauloensis* pela Sociedade Brasileira de Herpetologia, depois de uma análise combinada de caracteres morfológicos e moleculares de 32 espécies de *Bothrops*, 6 espécies de *Bothriopsis* e 5 espécies de *Bothrocophias* (FENWICK *et al.*, 2009). Atualmente, esta espécie é denominada como *Bothrops pauloensis*, voltando à taxonomia tradicional (CARRASCO *et al.*, 2012). Essa serpente é conhecida popularmente como jararaca pintada, boca de sapo, jararaca do rabo de osso e do rabo branco, sendo estes dois últimos devido ao fato dos animais adultos apresentarem a extremidade da cauda clara, geralmente de cor amarelada. Assim, essa serpente utiliza dessa característica para atrair a presa, ficando enrodilhada e movimentando a extremidade clara da cauda, semelhante a um verme, atraindo pequenos anfíbios (BELLUOMINI, 1987). Além disso, a *B. pauloensis* é encontrada preferencialmente em habitats úmidos no Brasil e na região meridional da América do Sul (IZIDORO *et al.*, 2003), sendo a terceira responsável pelos acidentes no estado de São Paulo e a maior responsável na região Nordeste (ROJAS *et al.*, 2005).

A peçonha de *B. pauloensis* consiste de cerca de 30% de PLA₂s, entre as quais podem ser isoladas as miotoxinas BnSP-7 e BnSP-6 (RODRIGUES *et al.*, 2012). Ambas são miotoxinas PLA₂-like, as quais apresentam a mutação por resíduo de lisina da posição 49, massa molecular entre 13,5 e 14 kDa e ponto isoelétrico de 8,8 (RODRIGUES *et al.*, 1998). Essas toxinas possuem elevado grau de identidade com outras proteínas dessa subclasse (RODRIGUES *et al.*,

1998; MAGRO *et al.*, 2003) (Figura 4) e não apresentam atividade catalítica, mas possuem a atividade miotóxica (TOYAMA *et al.*, 2001; MAGRO *et al.*, 2003).

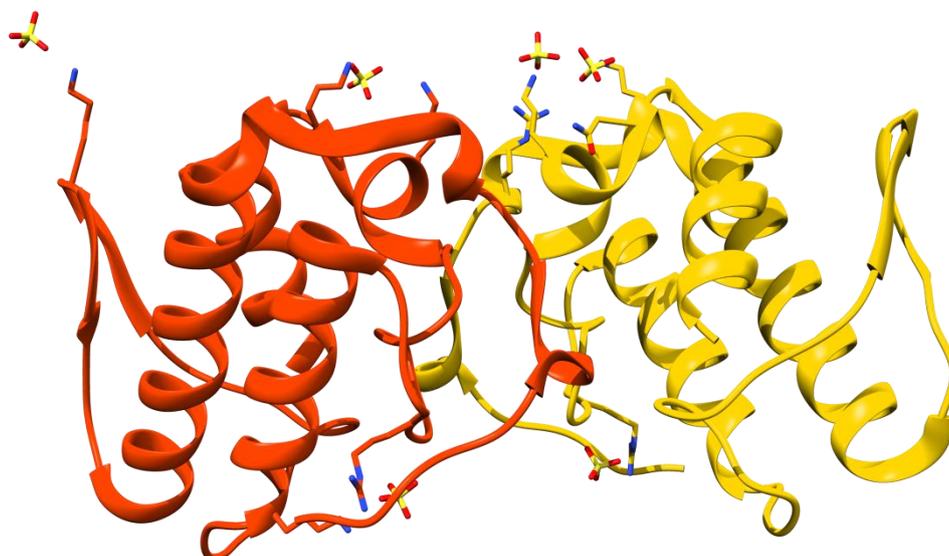


Figura 4. Representação da estrutura dimérica da BnSP-7 nativa. A toxina representada em *cartoon* apresenta sua composição homodimérica (monômero A e B, respectivamente em vermelho e amarelo) e os resíduos desta toxina em interação a íons SO_4^{2-} , ambos representados em *sticks*. Adaptado de LIMA *et al.* (2017).

1.6 Biotecnologia: Expressão heteróloga

O uso da biotecnologia para obter produtos de interesse humano vem largamente sendo utilizado e otimizado para várias aplicações, principalmente na área de fármacos. Os avanços científicos na biotecnologia, proporcionados pela pesquisa básica, tornou capaz a compreensão de como a vida é codificada (genoma, DNA) e, principalmente, como copiar e editar esse código (CONESA *et al.*, 2001). Assim, esses avanços têm cumprido um papel de destaque na descoberta de novos medicamentos biológicos, ganhando espaço no mercado farmacêutico. As estimativas de vendas de medicamentos desenvolvidos com o auxílio da biotecnologia (vacinas, moléculas recombinantes, microrganismos modificados, entre outros) mostram números acima de US\$ 280 bilhões em 2014, com a perspectiva de chegar a US\$ 445 bilhões até 2019 (DELOITTE, 2016). Compreendendo o apelo comercial e científico de enzimas e proteínas, se fazem necessárias novas tentativas para obter esses produtos, utilizando as ferramentas da biologia molecular moderna.

Ao longo das últimas décadas, microrganismos foram bioengenhierados com o intuito de melhorar a produção de proteínas heterólogas. Escolher o microrganismo mais apropriado para a produção de uma proteína recombinante é baseado nas necessidades desta, visando o sucesso no produto final. Entre tais necessidades citam-se: nível de expressão que se requer do produto, as características da proteína, o tamanho da proteína, estabilidade da proteína e, principalmente,

conseguir preservar a funcionalidade dessa proteína heteróloga de acordo com sua finalidade (SCHIMIDT, 2004). São diversos os modelos de expressão proteica: culturas de leveduras, bactérias, fungos filamentosos, insetos (via baculovírus), células de mamíferos e vegetais (via organismos transgênicos) *in vivo* e *in vitro* (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). Os hospedeiros mais utilizados para expressão de proteína heteróloga são as células de fungos e bactérias, pois sua fácil modificação genética, os seus genomas altamente conhecidos, velocidade de crescimento, rendimento elevado de expressão, facilidade de cultivo e rotas metabólicas diversas (diversidade de produtos finais) facilitam a obtenção do produto desejado de maneira segura e rápida (SCHIMIDT, 2004).

O sistema de expressão mais utilizado (na tecnologia do DNA recombinante) para etapas iniciais e primeira opção para os pesquisadores é a bactéria *Escherichia coli* (CHEN, 2012), por ser um organismo de fácil manipulação, alta produção e baixo custo, apesar de suas limitações a respeito de moléculas complexas e de proteínas derivadas de genomas eucarióticos (DALY; HEARN, 2005).

As leveduras são os sistemas de expressão mais recomendados quando se deseja produzir uma proteína de maior complexidade, como, por exemplo, com modificações pós-traducionais (DALY; HEARN, 2005). As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* têm-se mostrado altamente eficientes nos últimos 20 anos (DAMASCENO *et al.*, 2012; DEMAIN; VAISHNAV, 2009). Em consideração às diferentes características dos sistemas de expressão disponíveis, é necessária uma ampla investigação sobre tais sistemas, buscando o de melhor adequação para obtenção da proteína-alvo.

1.7 Levedura *Pichia pastoris* (*Komagataella pastoris*) e comparação com outros sistemas de expressão

A levedura *Pichia pastoris* pertence ao Reino *Fungi*, Divisão *Eumycota*, Subdivisão *Ascomycotina*, Classe *Hemoascomycetes*, Ordem *Endomycetales*, Família *Saccharomycetaceae* e Subfamília *Saccharomycetoideae* (KURTZMAN, 2009). Em 2005 essa levedura foi reclassificada no novo gênero *Komagataella* e dividida em 3 espécies: *K. pastoris*, *K. phaffii* e *K. pseudopastoris* (KURTZMAN, 2005). Os ambientes naturais dessas leveduras são insetos, solos, água doce, plantas, exsudados de árvores, frutas e como contaminantes em diversas bebidas e alimentos (OTAG *et al.*, 2005). Algumas espécies do gênero *Pichia* (*Komagataella*) auxiliam nos efeitos desejáveis em fases iniciais da fermentação para obtenção do vinho, na produção de diferentes tipos de queijos e outros bioprocessos amplamente utilizados na biotecnologia de alimentos (BAKIR *et al.*, 2004). Tendo como característica crescer em meio contendo apenas uma única fonte de carbono e energia (metanol), caracterizando-a como uma levedura metilotrófica. As leveduras do gênero *Pichia* possuem um forte promotor denominado

AOX1, o qual é ativado na presença de metanol e induz altos níveis de transcrição (CREGG, 2007; CEREGHINO; CREGG, 2000). Essa característica tornou a levedura *P. pastoris* um atraente sistema para a produção de proteínas heterólogas utilizando uma única fonte de carbono, além da vantagem do metanol inibir o crescimento de contaminantes. Ainda, essa levedura apresenta diversas vantagens em relação ao emprego da *Saccharomyces cerevisiae*, tais como maiores índices de produtividade (pelo fato de a *S. cerevisiae* não possuir um promotor induzível forte), crescimento em altas densidades celulares, ausência de hiper-glicosilação, via metabólica do metanol (uma vez que a *S. cerevisiae* utiliza de vias fermentativas), sistema de baixo custo para estabelecimento e manutenção, melhor secreção do produto recombinante e modificações pós-traducionais mais eficientes (CEREGHINO; CREGG, 2000; GREGG, 2000; LIU *et al.*, 2012; YESILIRMAK; SAUERS, 2009). Essa última característica é importante quando se busca a expressão de proteínas provenientes de eucariotos superiores, consistidas de múltiplas ligações dissulfeto ou que possuem glicosilação, fosforilação, a ausência de metionina terminal e/ou a não formação de oligômero para o desenvolvimento correto da proteína madura (DALY; HEARN, 2005).

A procura da expressão de proteínas com modificações pós-traducionais limita o emprego da bactéria *E. coli*, desprovida da maquinaria intracelular apropriada para o enovelamento correto dessas proteínas (DALY; HEARN, 2005). Deste modo, os produtos eventualmente podem se apresentar em fases insolúveis (como em corpos de inclusão), não enovelados, ou sem enovelamento condizente com a proteína nativa. Assim, seriam necessárias etapas adicionais para obtenção de uma proteína funcional, tais como reenovelamento e solubilização, diminuindo a relação custo-benefício de se empregar o sistema bacteriano de expressão (MARSTON, 1986; MAKRIDES, 1996).

As linhagens de células de mamíferos são uma abordagem mais cara, sendo seu emprego adequado para obtenção de pequenas quantidades de proteína recombinante com alto valor agregado (BROWN, 2003). Em relação ao emprego de células de insetos, utilizar baculovírus como vetor resulta em altas taxas de expressão, porém essas células transfectadas morrem e são lisadas após um pico de expressão, permitindo que o produto esteja sujeito às proteases liberadas (YIN *et al.*, 2007). Além disso, esses sistemas necessitam de condições complexas de cultivo e de transfecção viral enquanto que a *P. pastoris* necessita de manipulação genética e cultivo relativamente fáceis (McCARROLL; KING, 1997). Porém, para obtenção de glicoproteínas, as células de mamífero são as mais adequadas, pois são as únicas capazes de realizar glicosilação mais próxima ao padrão humano (GONÇALVES *et al.*, 2013).

Para estudos estruturais e funcionais, é necessário obter a proteína de interesse em grandes quantidades, em nível correto de maturação pós-traducional e na forma solúvel quando expressa. A levedura *P. pastoris* foi geneticamente modificada para expressar mais de 5.000 proteínas

heterólogas e avaliada para 70 fins industriais, farmacêuticos e de pesquisa básica nos últimos 25 anos (NARANJO *et al.*, 2019). Em suma, a escolha do sistema de expressão, linhagem e estratégia de cultivo a ser utilizada é de extrema importância, principalmente para obtenção de determinada proteína a ser submetida a análises de estabilidade e de enovelamento/conformações.

1.8 Expressão de miotoxinas do veneno de serpentes

Várias PLA₂s já foram expressas empregando a bactéria *E. coli* (LIANG *et al.*, 1993; OGAWA *et al.*, 1997; TSAI; WANG, 1998; GIULIANI *et al.*, 2001; CHIOATO *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2003). Em 2013, Silveira e colaboradores clonaram o cDNA que codifica determinada PLA₂ ácida (BmooPLA₂) do veneno de *Bothrops moojeni*, cuja forma recombinante apresentou atividade fosfolipásica e inibitória da agregação plaquetária de forma semelhante à da proteína nativa. Recentemente, isoformas de PLA₂s provenientes do veneno de *Bothrops ammodytoides* foram clonadas e expressadas em corpos de inclusão, demonstrando baixa atividade enzimática apesar de o produto apresentar estrutura secundária e massa molecular semelhante às outras PLA₂s (CLEMENT *et al.*, 2019).

A primeira proteína PLA₂-like recombinante que apresentou atividade funcional foi a BthTX-I (miotoxina nativa do veneno de *Bothrops jararacussu*), constituindo-se até então a única proteína PLA₂-like botrópica relatada (WARD *et al.*, 2001; SETO *et al.*, 2008). Entretanto, essa miotoxina foi expressa em corpos de inclusão, tornando-se necessário realizar etapas de solubilização, de purificação e de reenovelamento (WARD *et al.*, 2001). Deste modo, um método com várias etapas até a obtenção da proteína de interesse pode resultar em perdas significativas durante todo o processo, baixa produtividade e conseqüente aumento dos custos de produção da proteína expressa (SETO *et al.*, 2008).

Em consideração às informações levantadas, é possível notar o desafio na obtenção de miotoxinas nas condições requisitadas de estudos estruturais e funcionais, no caso, para proteínas de interesse médico e científico, cuja origem (venenos brutos) demanda cifras consideráveis. Deste modo, justifica-se o desenvolvimento de um processo eficiente e reprodutível dessas proteínas que permitam sua obtenção de maneira sustentável. Assim, foram propostas aqui a reprodução e adaptação dos protocolos de expressão heteróloga para obtenção das miotoxinas de *B. pauloensis* a partir do sistema de *P. pastoris*. Ainda, em perspectiva de estudos sequenciais, a técnica desenvolvida pode ser aplicada para produção de proteínas com mutações sítio-dirigidas, como modo de descobrir regiões desconhecidas das mesmas com relevância para suas ações farmacológicas (SÁ *et al.*, 2004). Em paralelo, inclusive para validação da eventual proteína recombinante, foram propostos estudos estruturais e funcionais destas miotoxinas nativas (BnSP-7 e BnSP-6), obtidos a partir do isolamento do veneno bruto

(RODRIGUES *et al.*, 1998). Tais estudos, com essas toxinas na forma *apo* e complexadas com ácidos graxos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica, têm importância ao permitir elucidar comparativamente a estrutura em sua forma inativa (sem ácido graxo no canal hidrofóbico) e a ação da toxina ao interagir com os diferentes ligantes. Deste modo, é possível entender melhor o papel de moléculas no canal hidrofóbico destas proteínas, região em que podem interagir inibidores de sua atividade (SOARES *et al.*, 2000; ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000; SOARES *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2008; BORGES *et al.*, 2017; SALVADOR *et al.*, 2018; CARDOSO *et al.*, 2018; CARDOSO *et al.*, 2020) ou ativadores da mesma (FERNANDES *et al.*, 2014; BORGES *et al.*, 2017).

1.9 Objetivos

- Realizar estudos estruturais com a miotoxina *PLA₂-like* BnSP-7 nativa e complexada aos ácidos caprílico, esteárico e tetradecanóico, com a finalidade de avançar no conhecimento do mecanismo de ação dessa miotoxina;
- Realizar estudos de clonagem e expressão da proteína BnSP-7 na forma recombinante, visando estabelecer bases para realização de mutações sítio-dirigidas.

Capítulo 2:

Material e Métodos

2.1 Estudos biofísicos

O fluxograma a seguir (Figura 5) exemplifica as etapas realizadas dos métodos biofísicos utilizados no presente trabalho.

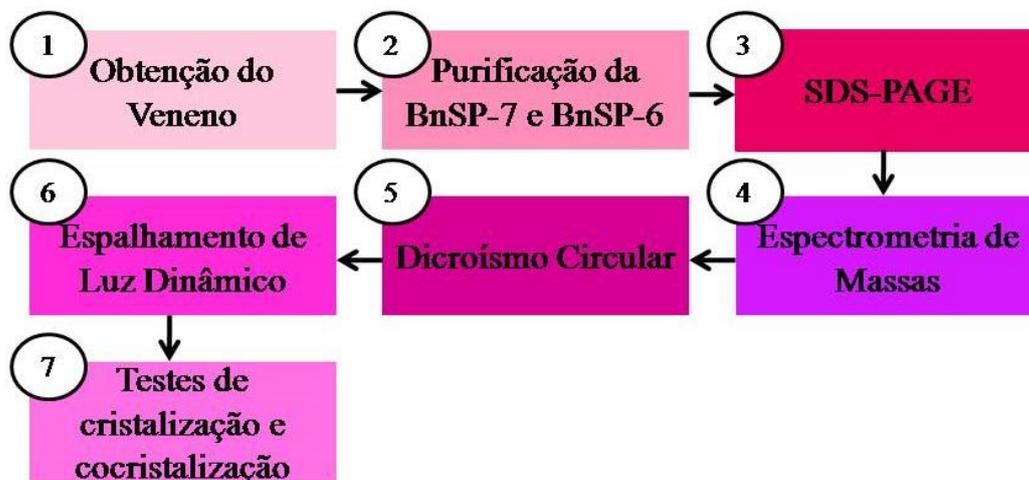


Figura 5. Fluxograma das atividades desenvolvidas com os métodos biofísicos.

2.1.1 Obtenção do veneno

O veneno bruto liofilizado de serpentes da espécie *Bothrops pauloensis* foi adquirido comercialmente no Centro de Extração de Toxinas Animais (CETA), localizada em Morungaba, São Paulo.

2.1.2 Purificação da BnSP-7 e BnSP-6

O veneno bruto foi diluído e homogeneizado em 500 μ L de bicarbonato de amônio (AmBic 50mM, pH 8,0) e então centrifugado a $10.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de cromatografia de troca catiônica HiTrap CM FF 5 mL (GE Healthcare) previamente equilibrada com o tampão de solubilização da amostra (AmBic 50mM, pH 8,0). A eluição foi realizada a partir de um gradiente binário de bicarbonato de amônio (AmBic 50-500 mM, pH 8,0), com comprimento de eluição de 30 volumes de coluna a um fluxo de trabalho de 1 mL/minuto. A eluição das frações foi monitorada por absorvância em ultravioleta (a 280nm). As frações que apresentavam proteínas de tamanho similar das fosfolipases A_2 (de acordo análise por SDS-PAGE 15% (m/v), detalhada no item a seguir) foram liofilizadas e subsequentemente dissolvidas em ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v) para posterior análise em cromatografia líquida em fase reversa, empregando uma coluna ShimPack CLC-ODS(M) 4,6 mm \times 25 cm (Shimadzu) pré-equilibrada com TFA 0,1% (v/v). As proteínas foram eluídas em um gradiente binário de acetonitrila (0-66,5% (v/v) em TFA 0,1% (v/v)), em um comprimento de 17,5 volumes de coluna a um fluxo de trabalho de 1mL/minuto. Da mesma

forma que na primeira etapa, a eluição das frações foi monitorada por absorvância em ultravioleta (a 280nm). Essas frações foram liofilizadas e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.1.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença do agente desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizada segundo a técnica descrita por Laemmli (1970). O sistema de SDS-PAGE descontínuo foi consistido pelo gel de concentração (poliacrilamida 6% (m/v), Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e SDS 0,1% (m/v)) e pelo gel de separação (poliacrilamida 15% (m/v), Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e SDS 0,1% (m/v)), além de persulfato de amônio 10% (m/v) e tetrametiletilenodiamina (TEMED), mantendo a relação de acrilamida/bisacrilamida em 30%:0,8% (m/v). Os géis foram preparados no sistema Mini-PROTEAN[®] TetraCell (Bio-Rad). As amostras proteicas foram solubilizadas em Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, glicerol 10% (m/v), β -mercaptoetanol 5% (m/v), SDS 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,001% (m/v) e posteriormente submetidas a aquecimento ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 5 minutos e aplicadas em gel de eletroforese. Para efeito de comparação de massa molecular das amostras foram utilizados padrões (Thermo Scientific) contendo nove proteínas entre 10 e 180 kDa. O tampão do eletrodo continha Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,19 M e SDS 0,1% (m/v) pH 8,3. Os ensaios de eletroforese foram realizados com diferença de potencial constante de 90 V durante aproximadamente 3 horas. Os géis foram corados em solução de Coomassie Blue R250 (Bio-Rad) 0,1% (m/v), ácido acético 10% (m/v) e etanol 50% (m/v) e descorado em solução de ácido acético 10% (m/v) e etanol 30% (m/v).

2.1.4 Processamento de amostras para Espectrometria de Massas (EM)

Através do método de EM, foram avaliadas as identidades das proteínas isoladas a partir dos protocolos de purificação realizados previamente.

2.1.4.1 Digestão enzimática das proteínas em solução

As amostras liofilizadas (50 μg de cada fração avaliada) foram solubilizadas em água pura (1 mg/mL) e alcalinizadas pela adição de 10 μL de bicarbonato de amônio (AmBic) 50 mM. Em seguida, receberam a adição de 25 μL de solução surfactante 0,2% (v/v) (RapiGest SF, Waters), para posterior agitação em vórtex e incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à etapa de redução, pela adição de 2,5 μL de ditioneitol 100 mM, agitação em vórtex e incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 40 minutos. Após voltar a temperatura ambiente, as amostras foram alquiladas, pela adição de 2,5 μL de iodoacetamida 300 mM, para sua agitação em vórtex e incubação por 30 minutos em ambiente sem iluminação. A digestão das amostras foi iniciada pela adição de 10 μL de tripsina (0,05 mg/mL) e incubada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em período *overnight*. A

interrupção dessa hidrólise ocorreu com a adição de 10 μL de TFA 5% (v/v), os quais foram mantidos a 37 °C por 90 minutos. Subsequentemente, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos (a $14.000 \times g$ e 6 °C), para transferência do sobrenadante a novos tubos estéreis. Os digestos foram secos em concentrador a vácuo e, posteriormente pré-purificados em tubos de concentração com resina C18 (Peptide Cleanup C18 Spin, Agilent Technologies), segundo as recomendações do fabricante. Os peptídeos resultantes foram ressuspensos em 108 μL de TFA 0,1% (v/v) (em acetonitrila 3% (v/v)) e 12 μL de amostra padrão (1 μM), para posterior transferência para os frascos de análise.

2.1.4.2 Sequenciamento peptídico por EM

Os experimentos *label free* de EM foram realizados em sistema de nanocromatografia líquida de rápida separação DionexUltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific). Neste sistema, as fases móveis utilizadas foram as soluções de A) ácido fórmico 0,1% (v/v) em água ultrapura e de B) ácido fórmico 0,1% (v/v) em acetonitrila 80% (v/v). Os peptídeos foram carregados em uma pré-coluna C18 30 $\mu\text{m} \times 5 \text{ mm}$ (Código 164649, Thermo Fisher Scientific) e homogeneizados em gradiente isocrático de 4% de B, por 3 minutos em um fluxo de trabalho de 300 nL/minuto. Em seguida, a cromatografia foi realizada em sistema *nanospray* PicoChip com coluna analítica ReproSil-Pur C18AQ (3 μm , 120 Å e 105 mm, Código 1PCH7515-105H354-NV) utilizando um gradiente linear composto por um gradiente binário de 4-55% de B por 30 minutos, seguido pelo gradiente de 55%-90% de B por 1 minuto e mantido no gradiente isocrático de 90% de B por 5 minutos, para posterior condicionamento a 4% de B por 20 minutos, a um fluxo de trabalho de 300 nL/minuto. O modo de operação utilizado foi ionização positiva pelo método DDA (aquisição dependente de dados). A busca precursora de íons ocorreu entre a relação massa-carga (m/z) de 200 e 2000, em resolução de 70.000 FWHM e 100 ms de injeção. A câmara de fragmentação foi condicionada com energia de colisão (NCE) entre 29 e 35% e o espectro de fragmentação (MS/MS) foi obtido com resolução de 17.500 FWHM, 50 ms de injeção e tempo de exclusão dinâmico de 10 s. Os dados experimentais foram adquiridos e processados por meio do *software* Xcalibur v. 4.0.27.19 (Thermo Fisher Scientific).

2.1.4.3 Análise dos dados

Os dados gerados foram analisados no *software* livre PatternLab for Proteomics v. 4.0.0.84 (CARVALHO *et al.*, 2017), de acordo com as especificações publicadas na literatura científica pelos seus criadores, em comparação às sequências primárias das proteínas da espécie *Bothrops pauloensis* depositadas no banco de dados livre Swiss-Prot para a obtenção da identificação das

proteínas nas amostras. Os principais parâmetros utilizados nesta ferramenta foram a seleção das proteínas no banco de dados; a informação da enzima empregada na digestão das amostras; a permissão de até 2 clivagens perdidas; a informação das modificações pós-traducionais de carbamidometilação dos resíduos de cisteínas e da variável oxidação dos resíduos de metionina; adoção dos erros de tolerância MS de 40 ppm e MS/MS de 0,02 ppm e da taxa máxima de FDR de até 1%.

2.1.5 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

A integridade da estrutura secundária da BnSP-7 e BnSP-6 isoladas do veneno bruto foi verificada por espectroscopia de dicroísmo circular no intervalo espectral de comprimento de onda de 185-260 nm, utilizando um espectropolarímetro JASCO J-815 (JASCO Spectroscopic Co., Ltd., Japão) equipado com um termocontrolador Peltier. Para isso, a BnSP-7 e sua isoforma BnSP-6 liofilizadas foram dissolvidas em água deionizada e filtradas (poros de 0,22 µm de tamanho), atingindo a concentração final de 0,5 mg/mL. Os experimentos foram realizados na presença de fluxo de nitrogênio gasoso, utilizando uma cubeta de quartzo de 0,5 nm, *scanning speed* de 100 nm/minuto, tempo de resposta de 1 s, *bandwidth* de 2 nm e 20 °C de temperatura. O espectro final corresponde à média de 20 acumulações medidas das amostras, já descontadas das acumulações medidas da solução, e normalizada através da transformação da unidade de miligraus para elipticidade residual média $[\theta]$ (em graus.cm².dmol⁻¹.resíduo⁻¹).

2.1.6 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A estimativa do raio hidrodinâmico e a polidispersividade da BnSP-7 e BnSP-6 em solução foram obtidos através do cálculo de seus coeficientes de difusão translacional a partir do movimento browniano dessas proteínas detectado pelos experimentos de espalhamento de luz dinâmico em um sistema DynaPro Titan (Wyatt Technology). Para isso, a BnSP-7 e sua isoforma BnSP-6 liofilizadas foram dissolvidas em água deionizada e filtradas (poros de 0,22 µm de tamanho), atingindo a concentração final de 3,3 mg/mL e 4,1 mg/mL, respectivamente. Assim, 100 medidas de cada toxina foram realizadas em diferentes temperaturas (de acordo com os ensaios de cristalização, descritos no item a seguir) e analisados no *software* Dynamics v. 6.10.

2.1.7 Testes de cristalização e cocrystalização

2.1.7.1 Obtenção dos ácidos graxos

Os ácidos graxos de origem vegetal (Figura 6) foram obtidos comercialmente na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), visando garantir o maior nível de pureza (superior a 97%) dos compostos utilizados como ligantes para a cocrystalização com as miotoxinas BnSP-7 e BnSP-6.

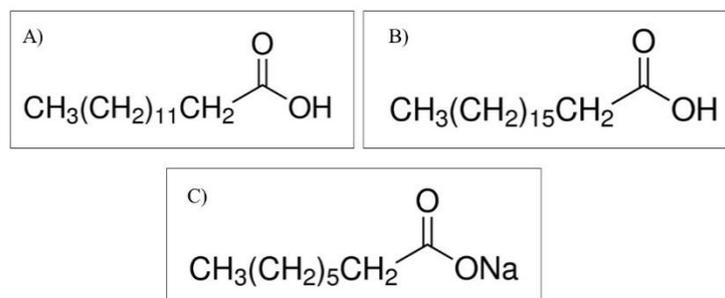


Figura 6. Estruturas dos ácidos graxos utilizados nos ensaios de cocrystalização. (A) ácido tetradecanóico (ácido mirístico), (B) ácido esteárico (ácido esteárico), (C) ácido caprílico (octanoato de sódio).

2.1.7.2 Obtenção dos cristais

Os experimentos de cristalização da BnSP-7 e BnSP-6 e a sua cocrystalização com os ácidos graxos (Figura 6) foram realizados pelo processo de *salting-out*, que se trata na preparação de uma solução contendo agente precipitante e proteína, com aumento gradativo da concentração do agente até a supersaturação da proteína (McPHERSON, 2009). Assim, os testes de cristalização foram realizados pelo método de difusão de vapor, onde o processo de equilíbrio de duas soluções (a primeira constituída pela solução do agente precipitante e a seguinte por esta solução em adição à solução de proteína) através da fase de vapor, em meio hermeticamente fechado (McPHERSON, 2009). Para tanto, as miotoxinas BnSP-7 e BnSP-6 nativas foram diluídas em água deionizada e filtradas (poros de 0,22 μm de tamanho), atingindo a concentração de 14,14 mg/mL e 12,7 mg/mL, respectivamente. Os ácidos graxos foram dissolvidos em água deionizada na concentração de 8,5, 9,1 e 5,3 mg/mL, respectivamente aos ácidos mirístico, esteárico e caprílico.

Os experimentos foram realizados em um sistema de placa do tipo “gota sentada” (*sitting drop*) roboticamente montada no aparelho Oryx8 (Douglas Instruments) e mantidas posteriormente a 283 K. Nelas, a cristalização da BnSP-6 ocorreu com a condição de cristalização (50 μL de reservatório) composta por cacodilato de sódio 100 mM (pH 6,7), polietileno glicol 8000 (PEG 8000) 36% (m/v) e sulfato de amônio 200 mM, enquanto que a gota foi composta por 0,5 μL de solução da proteína e por 0,5 μL da solução de cristalização. A cocrystalização da BnSP-6 com o ácido esteárico foi dada na condição (50 μL de reservatório)

composta por Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), PEG 4000 30% (m/v) e sulfato de lítio 100 mM, enquanto que a gota foi composta por 0,4 μ L de solução da proteína, 0,1 μ L de solução do ligante e por 0,5 μ L da solução de cristalização, o que resultou na proporção proteína/ligante de 1:20 (m/m).

2.1.7.3 Coleta e processamento de dados de difração de raios X

Os cristais foram montados em *loops* de nylon e mantidos em temperatura criogênica através de fluxo de gás nitrogênio a 100K, sem a presença de crio-protetor nos cristais. Esses foram submetidos a uma fonte de radiação Síncrotron (linha MX2, Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, Campinas, Brasil) e um detector Pilatus 2M (Dectris). Os dados de difração de raios-X foram coletados a um comprimento de onda de 1,459-1,500Å. A partir do conjunto de dados obtido, é possível determinar informações como grupo espacial, parâmetros de rede do cristal, número de monômeros da proteína na unidade assimétrica cristalina e previsão da porcentagem de água no cristal (McPHERSON, 2009). Os dados foram processados utilizando o pacote de programas AutoPROC v.1.0.5 (VONRHEIN *et al.*, 2011). Assim, gerou-se o mapa de densidade eletrônica, o qual foi utilizado para a modelagem da estrutura da proteína.

2.1.7.4 Refinamento e determinação da estrutura cristalográfica

O método de substituição molecular foi utilizado para resolução do problema das fases da radiação difratada, através do *software* Phaser (McCOY *et al.*, 2007), parte integrante do pacote de programas PHENIX (ADAMS *et al.*, 2010). Assim, foi utilizado como modelo as coordenadas cristalográficas da BnSP-6 previamente elucidada em sua forma *apo* (PDB 1PC9). Assim, o modelo foi devidamente posicionado na cela unitária da amostra por função de rotação e translação, baseado na comparação dos fatores de estrutura do modelo utilizado (F_{Calc}) e da amostra (F_{Obs}). Em seguida, foram realizados ciclos de refinamento e ajustes manuais do modelo através dos *softwares* PHENIX (ADAMS *et al.*, 2010) e Coot (EMSLEY *et al.*, 2010), para minimizar a energia livre, refinar as distâncias das ligações peptídicas, ângulos diédricos, interações atômicas, entre outros parâmetros, de acordo com os dados coletados. Esse ciclo foi realizado até atingir a máxima concordância entre F_{Calc} e F_{Obs} , avaliada pelos valores de R_{Free} e R_{Cryst} (McPHERSON, 2009).

2.2 Atividade hemolítica indireta

Para confirmação da ausência de atividade enzimática das proteínas PLA₂-like BnSP-7 e BnSP-6 (ou possível contaminação por alguma variante catalítica) foi utilizado o método da hemólise radial indireta em placas de Petri, conforme descrito por Gutiérrez e colaboradores

(1988). Dessa forma, para o preparo da solução de eritrócitos, coletou-se 3 mL de sangue humano, onde se adicionou solução de citrato de sódio 0,2%. Em seguida, as hemácias foram submetidas a 3 ciclos de lavagem com solução de NaCl 150 mM (1 volume de hemácias para 2 volumes de solução de lavagem). Após a lavagem, os eritrócitos foram ressuspensos em tampão fosfato salina (PBS) de modo a formar uma suspensão com 3% de hemácias. Preparou-se então a solução 1, formada por 3 mL da suspensão de hemácias, 150 µL de CaCl₂ 10 mM e 100 µL de suspensão de gema de ovo 10% (m/v). Em seguida, preparou-se a solução 2 composta por 180 mg de agarose e 15 mL de PBS, aquecidos ao microondas até a dissolução completa da agarose. Após breve resfriamento, as soluções 1 e 2 foram misturadas e plaqueadas. Após polimerização do gel, foram feitas perfurações circulares (1 mm de diâmetro) onde foram acrescentados 3 µL de cada amostra na concentração de 0,5 mg/mL. A placa foi incubada a 37°C em período *overnight*, para posterior verificação da formação do halo de hemólise ao redor da perfuração, como indicativo da atividade catalítica.

2.3 Clonagem e expressão da BnSP-7 recombinante (rBnSP-7)

O fluxograma da Figura 7 mostra as etapas realizadas para a expressão heteróloga da BnSP-7 em colaboração com a Dr^a. Camila Dantas Malossi do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da UNESP.

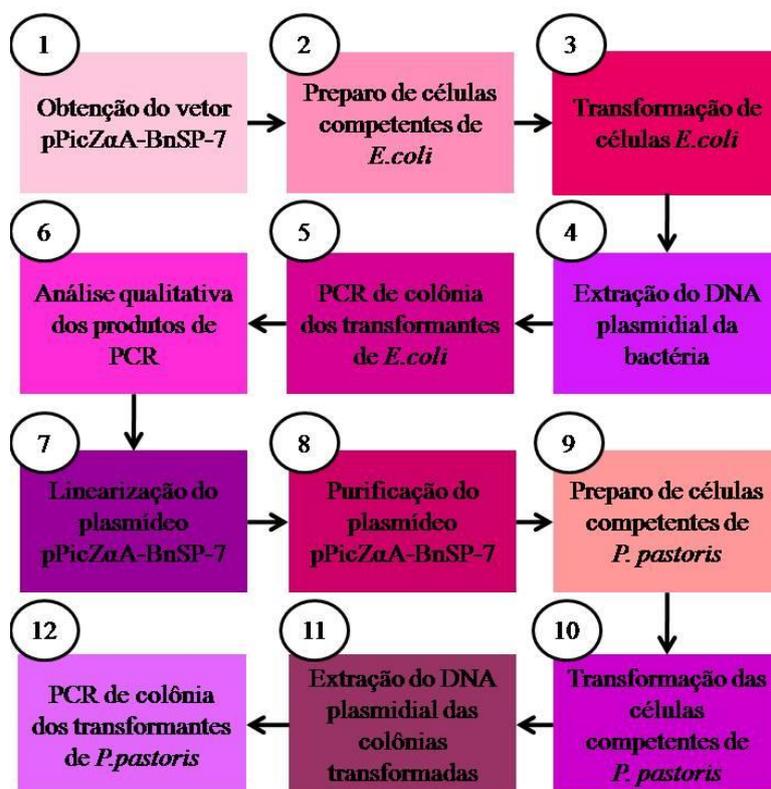


Figura 7. Fluxograma das atividades desenvolvidas de clonagem e expressão da rBnSP-7.

2.3.1 Obtenção do vetor pPicZaA para expressão em *Pichia pastoris*

O vetor pPicZaA, contendo a ORF (*open reading frame*) para a expressão da proteína PLA₂-like BnSP-7 (pPicZaA-BnSP-7) foi obtido a partir de síntese gênica pela GeneArt® (Life Technologies™). A ORF referente à sequência da proteína de interesse foi inserida no vetor entre os sítios de restrição EcoRI(3' DNA) e NotI(5' DNA) como visto na Figura 8.

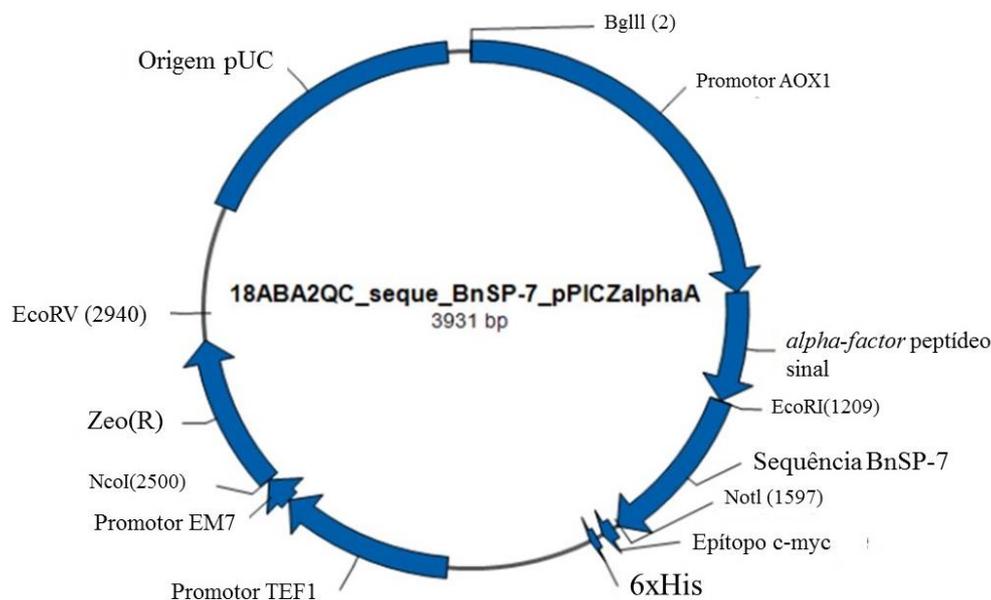


Figura 8. Vetor de expressão pPicZa (GeneArt®) contendo a sequência referente a BnSP-7. A ORF da BnSP-7 está inserida subjacente ao fator- α (responsável pelo direcionamento da proteína recombinante ao sobrenadante) e apresenta um sítio de restrição para EcoRI. O gene foi inserido de modo que a proteína fosse expressa com cauda de poli histidina na porção C-terminal. O vetor contém a marca de seleção que confere resistência a Zeocina™ e o epítipo c-myc, responsável pelo reconhecimento por anticorpos específicos.

2.3.2 Preparo de células competentes de *E. coli* linhagem DH5 α

Para receber o vetor de interesse, é necessário tornar competentes as células da bactéria *E. coli*, ou seja, é necessário desenvolver essa capacidade nas células, para viabilizar a introdução do DNA recombinado no hospedeiro selecionado. A linhagem DH5 α a ser transformada foi inoculada em 5 mL de meio Luria Bertani (LB) para crescimento por 16 horas, 250 rpm a 37 °C. A partir desse pré-inóculo, 2 mL foram diluídos em 100 mL de meio LB, nas mesmas condições de temperatura e agitação do pré-inóculo até atingir a densidade ótica (DO) por absorvância a 600 nm (A_{600}) de aproximadamente 0,4. Ao chegar nesse valor de DO, as células foram centrifugadas a 2450 $\times g$ durante 7 minutos. Descartado o sobrenadante, a cultura foi ressuspendida em 35 mL de CaCl₂ 0,1 M gelado e estéril e deixado em repouso por 20 minutos no gelo. Feita essa etapa, essa solução foi novamente centrifugada a 2450 $\times g$ por 7 minutos, o

sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 8 mL de CaCl₂ 0,1 M, acrescido de 2 mL de glicerol (50%). As células quimio-competentes foram estocadas a -80 °C até o momento do uso.

2.3.3 Transformação de células *E. coli* por choque térmico

Para realizar a transformação das células de *E. coli* foram utilizados 100 µL de bactérias quimio-competentes acrescidos de 5 µL do vetor contendo o gene a ser clonado. A solução (células +vetor) permaneceu incubada por 1 minuto e 20 segundos a 42 °C e após imediatamente transferidas para o gelo por 3 minutos. Posterior essa etapa, foram adicionados à solução 1 mL de meio LB *low salt* líquido e deixado em repouso por 1 hora a 37 °C. A solução foi plaqueada nos volumes de 50, 100 e 200 µL em meio LB *low salt* ágar contendo 25 µg/mL do antibiótico Zeocina™. As placas foram deixadas por 16 horas a 37 °C para o crescimento dos transformantes. As colônias que se mostraram resistentes ao antibiótico caracterizaram os possíveis clones. Essa etapa é necessária para o armazenamento do plasmídeo e obtenção de várias cópias do mesmo.

2.3.4 Extração do DNA plasmidial da bactéria *E. coli*

Para a obtenção do DNA plasmidial, foram selecionadas algumas colônias para realizar o pré-inóculo. As colônias selecionadas foram adicionadas a 3 mL de meio LB *low salt* líquido contendo 25 µg/mL de Zeocina™ e incubadas por 16 horas, 200 rpm a 37 °C. Após essa etapa o material foi submetido a extração do DNA seguindo as orientações do *kit* PureYield™ Plasmid Miniprep System. Ao final do processo o DNA foi quantificado por espectrofotometria óptica a 260 nm em um espectrofotômetro NanoDrop 2000 C (Thermo Scientific).

2.3.5 PCR de colônia dos transformantes de *E. coli*

Para a confirmação da inserção do plasmídeo na bactéria, um volume de 1 µL do preparado foi usado na *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Para a execução dos PCRs foi empregado o *kit* comercial GoTaq® Long PCR Master Mix (Promega®) junto com os *primers* específicos para a amplificação do gene de interesse (Tabela 1), totalizando um volume final de 25 µL conforme orientações do fabricante. Juntamente uma solução de controle negativo foi preparada nas mesmas condições com adição de água *nuclease-free* no lugar da amostra. As amostras foram submetidas a temperaturas variáveis de acordo com o programa utilizado para a amplificação do produto: 94 °C para a desnaturação térmica inicial por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação das fitas de DNA a 94 °C (45 segundos), anelamento e hibridização dos *primers* a 51 °C (45 segundos) e extensão a 72 °C (60 segundos). Para a extensão final das fitas foi

aplicada a temperatura de 72 °C por 10 minutos e as amostras foram mantidas 4 °C até a retirada do termociclador.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho.

Oligonucleotídeo	Sequência
Fita G	5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'
OverhangFw	5'-CTGGCCGTCGTTTTACTTAGGGTTAGGGTTAGG-3'
OverhangRv	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
5' AOX	5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3'
3' AOX	5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'

2.3.6 Análise qualitativa dos produtos de PCR

Com o propósito de confirmar a presença do vetor, o produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com SYBR[®] 22 Safe DNA Gel Stain (Invitrogen[®]). A corrida foi realizada aplicando 80 V por 10 minutos e 100 V por 20 minutos. O marcador de massa molecular Quick-Load[®] DNA Ladder 1kb (New England Biolabs[®]) foi utilizado como referência.

2.3.7 Linearização do plasmídeo pPicZαA-BnSP-7

A reação de linearização do plasmídeo pPicZαA contendo sequência que codifica a proteína referente a BnSP-7 é necessária para a integração do cassete de expressão no genoma da levedura, assim, esta foi preparada utilizando tampão da enzima 1x, 20 U da enzima *SacI* (Invitrogen[®]), cerca de 5-10 µg do material obtido da *miniprep* e água deionizada, totalizando 100 µL. A digestão foi realizada por 4 horas a 37 °C. Em seguida a enzima *SacI* foi inativada a 65 °C por 20 minutos e a reação foi analisada em gel de agarose a 1% para confirmação do plasmídeo linearizado.

2.3.8 Purificação do plasmídeo pPicZαA-BnSP-7

Nessa etapa foram utilizadas duas estratégias de purificação para tentar obter um resultado otimizado:

- **Estratégia 1:** as bandas que apareceram no gel de plasmídeo pPicZαA-BnSP-7 linearizado foram purificadas com o uso dos *kits* Illustra[®] GFX[®] PCR DNA e Gel Band Purification Kit[®] (GE Healthcare[®]), com base no protocolo sugerido pelo fabricante para a purificação de DNA a partir de misturas de PCR. Em seguida, o material foi quantificado com o fluorímetro Double Stranded DNA Quantus[®] (Promega[®]) em associação com o *kit*

Qubit[®] dsDNA HS Assay[®] (Life Technologies, USA) e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de sua utilização.

- **Estratégia 2:** O material linearizado foi precipitado adicionando-se acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e etanol 100% gelado. Essa solução permaneceu por 20 minutos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posteriormente foi centrifugado a $1500\times g$ por 10 minutos. Em seguida, ao *pellet* foram adicionados 500 μL de etanol 80% gelado, novamente centrifugado a $1500\times g$ por 10 minutos a temperatura ambiente, ressuspensionado em 50 μL de água deionizada e quantificado por espectrofotometria ótica utilizando-se a absorvância a 260 nm.

2.3.9 Preparo de células competentes de *P. pastoris* linhagem KM71H

O preparo das células competentes de *P. pastoris* linhagem KM71H foi realizado segundo o protocolo descrito por Cregg (2007). As células originais de *P. pastoris* foram pré-inoculadas em 5 mL de meio YPD (2% de peptona, 1% de extrato de levedura, 2% de glicose) e incubadas por 9 horas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 250 rpm. Desse pré-inóculo, 50 μL foram retirados e adicionados em frasco Erlenmeyer de 500 mL, contendo 50 mL de meio YPD. Esse material foi incubado a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 250 rpm até atingir uma DO a A_{600} entre 1,2 e 1,4. As células foram então coletadas e centrifugadas a $1500\times g$ por 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e ressuspensionadas em 10 mL de YPD acrescido de 170 mM de HEPES. Posteriormente, foram adicionados a essa solução 250 μL de ditionitrotol (DTT). Esse material foi incubado por 15 minutos a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ sem agitação. Em seguida, foi adicionada água deionizada estéril até um volume final de 50 mL e centrifugado a $1500\times g$ por 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido adicionando 25 mL de água destilada estéril às células. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e foram adicionados 2 mL de sorbitol 1 M estéril, as células foram centrifugadas em um novo ciclo ($1500\times g$, por 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ao final o sobrenadante foi descartado e as células submetidas a um último ciclo de centrifugação. Ao final deste, as células foram ressuspensionadas em 100 μL de sorbitol 1 M estéril e imediatamente utilizadas para a transformação.

2.3.10 Transformação das células competentes de *P. pastoris* por eletroporação

Em um tubo de 1,5 mL foram colocados 15 μL de DNA linearizado de cada estratégia de purificação e 40 μL de células competentes. Essa solução foi transferida para cubeta 0,2 cm (Bio-Rad[®]) seguindo-se uma incubação em gelo por 5 minutos e submetidas a um pulso de eletroporação em aparelho GenePulser II (Bio-Rad[®]). Imediatamente após o choque, foi adicionado as células 1 mL de sorbitol 1 M a cubeta e transferido para um tubo de 15 mL. As células foram incubadas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas sem agitação. Posteriormente 50, 100 e 200 μL das células foram plaqueadas em meio YPD ágar (peptona 2%, extrato de levedura 1%, glicose 2%,

ágar 1,5%) contendo 100 e 500 µg/mL de ZeocinaTM para a seleção dos transformantes, onde permaneceram incubadas por 4 dias a 30 °C.

2.3.11 Extração do DNA plasmidial das colônias transformantes de *P. pastoris*

Para essa etapa, utilizaram-se dois protocolos para lisar a parede celular eucariótica objetivando extrair o DNA plasmidial:

- **Protocolo 1:** As colônias escolhidas foram inoculadas em tubos de 1,5 mL contendo 20 µL de 0,2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), em seguida a solução contendo as células foram incubadas em banho seco por 3 minutos a 90 °C. Após a incubação, as amostras foram submetidas a centrifugação por 30 segundos a 12.000 ×g. Como molde para o PCR foi utilizado 1 µL do sobrenadante.
- **Protocolo 2:** As colônias escolhidas foram inoculadas em tubos de 1,5 mL contendo 20 µL de NaOH 20 mM prosseguidas de incubação por 45 minutos a 95 °C. Ao término da incubação as amostras foram centrifugadas por 10 minutos em velocidade máxima. Como no protocolo anterior, foi utilizado 1 µL para a reação de PCR.

2.3.12 PCR de colônia dos transformantes de *P. pastoris*

Para o PCR de colônia, a reação foi preparada utilizando os mesmos *primers* e reagentes do PCR de colônia da bactéria (*kit* comercial GoTaq[®] Long PCR Master Mix, Promega[®]) totalizando um volume final de 25 µL. A reação foi realizada mantendo o termociclador por 3 minutos a 94 °C para a desnaturação inicial, 35 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 52 °C por 90 segundos e 72 °C por 4 minutos, sendo a extensão final 72 °C por 10 minutos e posteriormente a 4 °C. Os produtos obtidos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1% (etapa 2.3.6).

2.4 Testes de viabilidade do antibiótico e das células de *P. pastoris* KM71H

2.4.1 Teste de sensibilidade a antibióticos

2.4.1.1 ZeocinaTM

O teste de sensibilidade a ZeocinaTM foi conduzido com células da bactéria *E. coli* DH5α original semeadas por espalhamento em placas de Petri. Foram utilizadas 4 placas contendo 15 mL do meio LB *low salt* ágar proporções de pré-inóculo e antibiótico apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Proporções de células/antibiótico para o teste de qualidade da ZeocinaTM.

Placas	Concentração de células (μL)	Concentração de Zeocina TM ($\mu\text{g/mL}$)
1	50	30
2	100	100
3	200	100
4	200	500

Após a semeadura, as placas foram incubadas por 16 horas a 37 °C. Concomitantemente, para eliminar a variável de sensibilidade a temperatura que o antibiótico possui, realizou-se um segundo teste utilizando quatro tubos cônicos contendo 5 mL de meio LB líquido, como a técnica de semeadura em meio líquido foi por difusão, utilizou-se duas concentrações diferentes do antibiótico, sendo assim, as concentrações testadas estão mostradas na Tabela 3. As células foram incubadas a 37 °C, 200 rpm por 16 horas.

Tabela 3. Concentrações de antibióticos utilizados no teste de viabilidade.

Antibiótico	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)			
Zeocina TM	30	170	330	500
Canamicina	30	170	330	500
Cloranfenicol	30	170	330	500

2.4.1.2 Canamicina

Nessa etapa o antibiótico testado foi a canamicina com a intenção de comparar a eficiência de inibição bacteriana com o antibiótico utilizado nesse trabalho (ZeocinaTM). As células de *E. coli* foram inoculadas em 4 tubos cônicos contendo o meio LB líquido. As concentrações de antibiótico e condições de temperatura, agitação e tempo foram as mesmas do teste com a ZeocinaTM (Tabela 3).

2.4.1.3 Cloranfenicol

O antibiótico cloranfenicol foi testado para os estudos de comparação entre os outros dois antibióticos. Os experimentos foram conduzidos igualmente como citados no teste com a canamicina (concentração, temperatura, agitação, tempo e meio de cultura).

2.4.2 Avaliação de contaminantes nas células originais de *P. pastoris* KM71H

O teste foi realizado para avaliar a viabilidade das células de *P. pastoris* e identificação de uma possível contaminação por outras culturas de microrganismos. Semearam-se por esgotamento células originais da levedura *P. pastoris* KM71H em placas contendo meio McConkey e meio ágar sangue seguidas de incubação por 24 horas a 37 °C. Posteriormente às 24 horas de incubação, realizou-se um teste de coloração de Gram para a identificação dos microrganismos que cresceram nas placas semeadas.

Capítulo 3:

Resultados e discussão

3.1 Purificação da BnSP-7 e BnSP-6

O veneno bruto de *B. pauloensis* foi fracionado por cromatografia de troca iônica do tipo catiônica fraca, obtendo-se as 3 frações nomeadas CM1, CM2 e CM3 (Figura 9A). As frações (CM2 e CM3) avaliadas por SDS-PAGE 15% que apresentaram massa molecular semelhante às PLA₂s (Figura 9A) foram submetidas à cromatografia em fase reversa (Figuras 9B e 9C). O fracionamento de CM2 e CM3 resultou na coleta das frações majoritárias denominadas FR1-CM2, FR2-CM2 (Figura 9B), FR1-CM3 e FR2-CM3 (Figura 9C), os quais foram submetidos à análise por espectrometria de massas para obtenção de suas identidades. As frações foram quantificadas pelo método de absorvância em ultravioleta (280 nm) em um espectrofotômetro Nanodrop 2000C (Thermo Scientific), empregando os parâmetros para proteínas totais para a fração CM2 e os dados físico-químicos da BnSP-7 para a fração CM3. Assim, foi estimado cerca de 80% de rendimento de amostra injetada para o fracionamento da FR1-CM2, 5,31% para o FR2-CM2, 20% para o FR1-CM3 e 19,9% para o FR2-CM3.

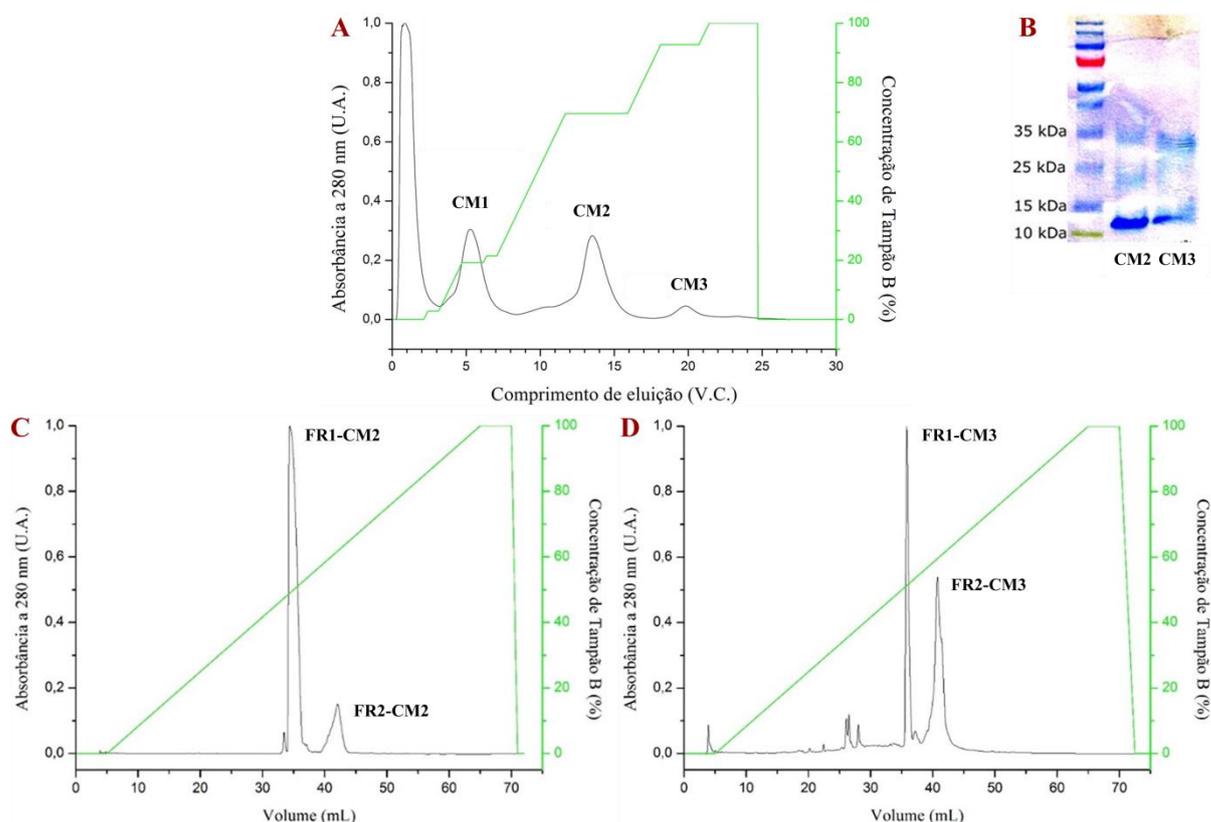


Figura 9. Fracionamento do veneno bruto de *B. pauloensis*. (A) Cromatografia líquida de troca iônica do veneno bruto. (B) SDS-PAGE 15% das frações coletadas em A. (C) Cromatografia líquida em fase reversa da fração CM2. (D) Cromatografia líquida em fase reversa da fração CM3.

O fracionamento do veneno bruto de *B. pauloensis* por cromatografia de troca iônica apresentou relativo padrão de repetição dos cromatogramas (RODRIGUES *et al.*, 1998; AZEVEDO *et al.*, 2016; BORGES *et al.*, 2016). A obtenção da BnSP-6 e BnSP-7 pelo protocolo

original (RODRIGUES *et al.*, 1998) determinou a atual nomenclatura destas toxinas (Fração 6 e 7 da cromatografia de troca iônica do veneno de *Bothrops neuwiedi* de Botucatu/SP, respectivamente BnSP-6 e BnSP-7) e pouco difere do padrão cromatográfico com o mesmo protocolo de isolamento com o veneno desta espécie localizada em Batatais/SP (AZEVEDO *et al.*, 2016; BORGES *et al.*, 2016). A proximidade dessas duas últimas frações (6 e 7) no cromatograma indicam a semelhança de pI entre ambas (RODRIGUES *et al.*, 1998; AZEVEDO *et al.*, 2016; BORGES *et al.*, 2016), demonstrada de modo mais evidente no cromatograma do protocolo original de separação do veneno bruto, na qual a última fração mostrou uma subfração minoritária sendo esta denominada como fração 6 (correspondente a BnSP-6) (RODRIGUES *et al.*, 1998). Contudo, o resultado com tal protocolo não foi devidamente replicado ao utilizar veneno de *B. pauloensis* de serpentário de Morungaba/SP, em que foram eluídas apenas três frações, sendo a terceira fração identificada pelo autor como a fração que correspondia as proteínas BnSP-6 e BnSP-7 (LIMA *et al.*, 2017). Tal discrepância de resultados poderia ser explanada por variedade biológica entre as espécies dessas regiões (seja por idade e gênero dos animais utilizados, ou mesmo a fonte da recepção dos animais pelos serpentários destas cidades), porém não foi indicada nenhuma alteração no padrão cromatográfico do fracionamento deste veneno de Morungaba/SP em estudo recente (BORGES *et al.*, 2018).

No presente estudo, utilizando-se do mesmo protocolo de purificação, coluna cromatográfica e fonte do veneno bruto de Lima e cols. (2017), foi obtida resposta de fracionamento com a presença de uma fração adicional. Além disso, as características de SDS-PAGE 15% deste estudo com os de Lima e cols. (2017) apresentam informações contraditórias entre si. Ao passo que a última fração (CM3) do estudo de 2017 (Figura 1C de Lima e cols., 2017) esteja apenas com proteínas de tamanho de ≈ 13 kDa, o presente estudo claramente demonstra mais de uma massa molecular para a fração equivalente (Figura 9B). De maneira intrigante, a submissão da CM3 (LIMA *et al.*, 2017) em cromatografia em fase reversa teve como produto 4 subfrações, entre as quais apenas uma com tamanho molecular de PLA₂, a qual foi atribuída a identidade da BnSP-7. A principal semelhança desse trabalho com o presente estudo foi a existência de proteínas de massa de PLA₂ nas frações equivalentes da CM2 (Figura 9B), porém sem a devida identificação sequencial em ambos. Deste modo, frente a diversas diferenças encontradas entre os estudos analisados (RODRIGUES *et al.*, 1998; BORGES *et al.*, 2016; AZEVEDO *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2017), foi esperada a obtenção de resultados distintos entre as cromatografias líquidas em fase reversa dos mesmos.

Vale ressaltar que os estudos que realizaram o sequenciamento da região N-terminal da BnSP-7 (BORGES *et al.*, 2016) e da BnSP-6 (AZEVEDO *et al.*, 2016), as quais deveriam distingui-las entre si, não indicaram o resíduo que as diferem (de acordo com as sequências

primárias das estruturas 1PC0 e 1PC9 depositadas no PDB). Assim, os autores destes estudos garantiram as devidas identidades destas toxinas, apenas pela origem de cada fração coletada a partir da cromatografia de troca iônica do veneno bruto. As diferenças observadas entre os cromatogramas apresentados e descritos no presente estudo podem ser explanados por dois motivos: a provável diferença de resolução das colunas utilizadas nos estudos (tamanhos de poros diferentes, porém não informados nos métodos do trabalho), apesar da resina informada ter sido a mesma (CM-Sepharose, GE Healthcare) (RODRIGUES *et al.*, 1998; AZEVEDO *et al.*, 2016; BORGES *et al.*, 2016; BORGES *et al.*, 2018); e a extensa variabilidade ontogenética, biológica e ambiental que diferem a quantidade e composição de moléculas existente nos venenos de serpentes (SANZ *et al.*, 2019). De modo semelhante, investigações bioquímicas e venômicas têm revelado consistentemente diferenças composicionais, funcionais e imunológicas notáveis nos venenos das variantes geográficas da víbora-de-Russell (*Daboia Ruselli*) em todo o subcontinente indiano (PLA *et al.*, 2019). Deste modo, frente aos pontos levantados entre os estudos com as miotoxinas BnSP-7 e BnSP-6, foi justificada a devida investigação da identidade das proteínas aqui isoladas (das frações CM2 e CM3) por espectrometria de massas.

3.2 Espectrometria de massas (EM)

As frações coletadas a partir da cromatografia em fase reversa (FR1-CM2, FR2-CM2, FR1-CM3 e FR1-CM3) foram investigadas pela técnica de espectrometria de massas, em colaboração com a Dr^a. Lucilene Delazari (CEVAP), com o intuito de confirmar a identidade das toxinas BnSP-7 e BnSP-6, bem como sua fração de origem. As análises iniciais destas amostras indicaram a presença de proteínas PLA₂-like nas frações FR1-CM2 e FR1-CM3 e a ausência das mesmas nas frações FR2-CM2 e FR2-CM3, sugerindo que tais proteínas correspondam as demais amostras “contaminantes” visualizadas em SDS-PAGE de massa molecular superior a 15 kDa (Figura 9B). Apesar da confirmação da presença de PLA₂ nas amostras FR1-CM2 e FR1-CM3, não foi possível distinguir as suas identidades entre a BnSP-7 e a BnSP-6, devido ao fato de não ter sido detectado na análise qualquer peptídeo da região onde fica localizado a única mutação que as diferem entre si (PDB 1PC0 e 1PC9). Deste modo, novos experimentos e análises foram realizados inicialmente com a fração FR1-CM3. Porém, a análise foi focada somente sobre os íons carregados de valores de massas teóricas próximos dos pequenos fragmentos (m/z entre 300 e 500 Da) que permitiriam a diferenciação da identificação de ambas às toxinas. Assim, 85% dos resíduos da FR1-CM3 foram detectados, ainda sem a possibilidade de diferenciação entre as proteínas BnSP-7 e BnSP-6 (Tabela 4).

Tabela 4. Alinhamento da sequência de resíduos de aminoácidos da BnSP-6 e BnSP-7.

PDB	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	P	A	K	S	Y	G	A	Y	G	C	N	C	G	V	L	G	R	G	Q	P	K	D	A	T
(BnSP-6)	D	R	C	C	Y	V	H	K	C	C	Y	K	L	T	G	C	D	P	K	K	D	R	Y	S	S	W	K	D	K	T	I	V	C	G	E	N	N	P		
	C	L	K	E	L	C	E	C	D	K	A	V	A	I	C	L	R	E	N	L	G	T	Y	N	K	K	Y	R	H	L	K	P	F	C	K	K	A	D	P	C

PDB	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	P	A	K	S	Y	G	A	Y	G	C	N	C	G	V	L	G	R	G	Q	P	K	D	A	T
(BnSP-7)	D	R	C	C	Y	V	H	K	C	C	Y	K	L	T	G	C	D	P	K	K	D	R	Y	S	S	W	K	D	K	T	I	V	C	G	E	N	N	P		
	C	L	K	E	L	C	E	C	D	K	A	V	A	I	C	L	R	E	N	L	G	T	Y	N	K	K	Y	R	H	L	K	P	F	C	K	K	A	D	P	C

Os resíduos de aminoácidos em destaque (em cinza) identificam os fragmentos detectados semelhantes à respectiva toxina informada, enquanto que os resíduos destacados em vermelho identificam a única diferença entre as toxinas BnSP-6 e BnSP-7.

Apesar de ter sido utilizado um espectrômetro de elevada capacidade de resolução de detecção, os peptídeos encontrados não permitiram a devida identificação das frações de PLA₂. O fato da pequena região de interesse estar compreendida entre duas regiões de clivagem da tripsina (resíduos de arginina e lisina) pode sugerir a necessidade da seleção de outra enzima para digestão das frações FR1-CM2 e FR1-CM3. Além disso, na possibilidade dos peptídeos gerados dessa região de interesse demonstrar a característica de não-ionização, outras técnicas de elucidação estrutural primária devem ser adotadas, como por exemplo, a técnica de cristalografia desenvolvida no presente estudo. Porém ainda se faz necessário a atualização dos bancos de dados que são utilizados para comparações de sequenciamento de estruturas primárias, já que os bancos disponíveis se encontram em confiabilidade duvidosa e limitados para tais comparações. Corroborando com essa ideia, ainda existem situações nas quais o genoma de uma determinada espécie não está completamente disponível ou sequenciado. Neste cenário, é necessário derivar a sequência primária de aminoácidos de um determinado peptídeo baseada única e exclusivamente nos dados obtidos por espectrometria de massas sem recorrer a banco de dados, ou seja, pelo método conhecido por sequenciamento *de novo* (CANTÚ *et al.*, 2008). Este seria de relevante importância para atualizar os bancos de sequenciamento primário de moléculas utilizando como ferramenta a espectrometria de massas.

3.3 Dicroísmo Circular (CD)

Para continuar a caracterização das proteínas, os estudos estruturais foram realizados com amostras de miotoxinas BnSP-7 e BnSP-6 isoladas pelo mesmo protocolo (item 2.1.2) e cedidas pelo colaborador Dr. Andreimar M. Soares (FIOCRUZ/RO). Assim, essas amostras foram submetidas a ensaios de espectroscopia de dicroísmo circular para avaliação inicial da

integridade das estruturas secundárias destas miotoxinas PLA₂-like. Para cada toxina, foi obtido um espectro de CD (Figura 10) que apresentou características similares entre si e esperadas a estas e outras PLA₂s, como a predominância de estruturas em hélices- α , corroborada pela obtenção dos valores mínimos de elipticidade molar residual em 222 nm e 208 nm e do valor máximo em 191 nm (LIMA *et al.*, 2017; CEDRO *et al.*, 2018).

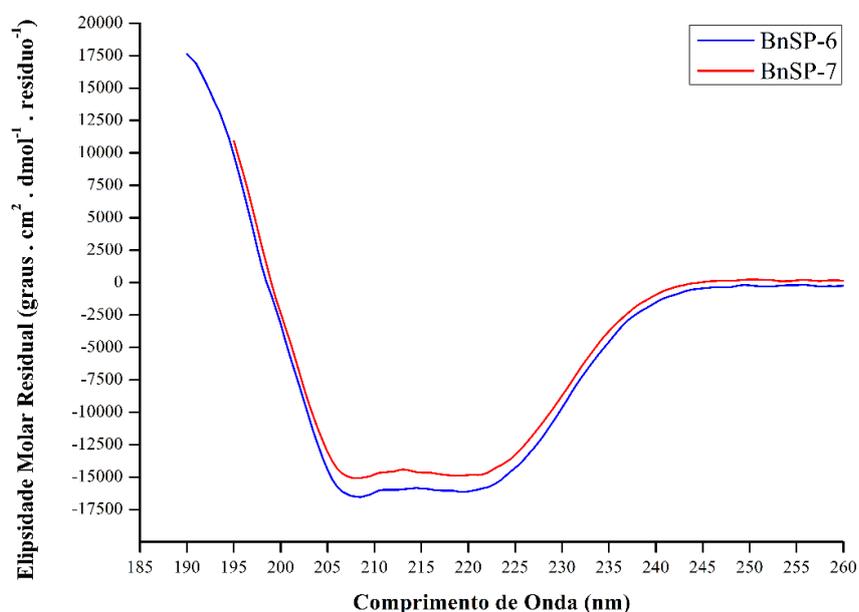


Figura 10. Espectro de dicroísmo circular da BnSP-7 e BnSP-6 diluídas em água ultrapura na concentração de 0,5 mg/mL.

3.4 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A informação da dinâmica das partículas nos experimentos de DLS é derivada a partir da flutuação da intensidade espalhada pela amostra durante um intervalo de tempo definido no experimento (HOFMANN, 2010). Assim, foi possível estimar o raio hidrodinâmico e a polidispersividade das miotoxinas BnSP-7 e BnSP-6. Abaixo foram demonstrados os resultados obtidos por DLS da de ambas as toxinas em diferentes temperaturas (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) da BnSP-7 (3,0 mg/mL em água deionizada)

BnSP-7 (3,1 mg/mL)	Raio hidrodinâmico (nm)	Polidispersividade (%)
10 °C	3,7	31,7
20 °C	2,2	40,1
25 °C	3,4	45,8
37 °C	3,4	41,4

Tabela 6. Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) da BnSP-6 (2,2 mg/mL em água deionizada)

BnSP-6 (2,2 mg/mL)	Raio hidrodinâmico (nm)	Polidispersividade (%)
10 °C	1,6	15,4
20 °C	1,4	21,3
25 °C	2,4	30,0
37 °C	3,8	22,3

A análise dos experimentos de DLS apresentam a BnSP-7 com elevada polidispersividade ($Pd > 15\%$) em todas as temperaturas (Tabela 5), corroborando a dificuldade em obter monocristais BnSP-7 nos testes de cristalização. A 20 °C a BnSP-7 mostrou um raio hidrodinâmico médio que corresponde a outras proteínas PLA₂-like botrópicas em solução em uma conformação dimérica (FERNANDES *et al.*, 2010; SALVADOR *et al.*, 2013; CARDOSO *et al.*, 2018; CARDOSO *et al.*, 2020). Entretanto, o índice de Pd indica que a distribuição de tamanho molecular da proteína está heterogênea, demonstrando diversos estados oligoméricos nesta solução, dificultando o processo de cristalização desta proteína. Enquanto isso, a BnSP-6 apresenta o melhor índice de Pd a 10 °C, denotando maior homogeneidade em relação às demais condições, favorecendo assim sua cristalização ($Pd \approx 15\%$) (FERRÉ-D'AMARÉ & BURLEY, 1997). Além disso, a estimativa do raio hidrodinâmico da BnSP-6 em água permite sugerir o comportamento oligomérico em monômeros nas temperaturas mais baixas (10-20 °C), a medida que se aparecem dímeros (25 °C) e tetrâmeros (37 °C). Contudo, o índice de Pd nestas temperaturas mais elevadas (> 10 °C) indica heterogeneidade da amostra, denotando mistura de estados oligoméricos desta proteína. Deste modo, apesar dos estudos cristalográficos anteriores com estas toxinas utilizarem água deionizada para solubilização das amostras (FONTES *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2017), os ensaios de DLS realizados indicam a necessidade de se buscar novas alternativas de solubilização dessas proteínas, com o intuito de diminuir sua heterogeneidade e, conseqüentemente, aumentar a taxa de sucesso de sua cristalização.

3.5 Testes de cristalização da BnSP-7 e BnSP-6 nativas e cocrystalizadas com ácidos graxos

Inicialmente, os testes de cristalização foram realizados com as amostras de proteínas identificadas por protocolos anteriores como BnSP-7 e BnSP-6, utilizando as principais condições de cristalização conhecidas para estas e outras proteínas PLA₂-like botrópicas (FONTES *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2017; SALVADOR *et al.*, 2017; CARDOSO *et al.*, 2018). Entre as melhores condições obtidas e suas otimizações (Tabela 7), a condição de cristalização denominada 1.2A permitiu a obtenção de monocristais hexagonais da amostra BnSP-6 após 5 dias de incubação a 283 K (Figura 11A), os quais foram retirados para coleta de dados de

difração de raios X após 21 dias de incubação (Figura 11B). Apesar de já ter sido obtidos monocristais de BnSP-7 nas condições utilizadas de solubilização da toxina e de sua cristalização (FONTES *et al.*, 1999), não foi possível obter cristais a partir da amostra identificada como BnSP-7. Tal situação foi dada provavelmente pelo elevado índice de Pd da BnSP-7 (Tabela 5), podendo ser revertida com a diálise da amostra em outras condições de solubilização da toxina (com tamponamento salino, por exemplo), até a obtenção de uma maior homogeneidade dessa amostra em solução (Pd < 15%).

Tabela 7. Condições de cristalização avaliadas de melhores resultados obtidos.

Condição 1.2A	Condição 3A	Condição 4A	Condição 5.4A
C ₂ H ₆ AsNaO ₂ (pH 6,7) (0,1 M)	KSCN (0,15 M)	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (pH 5,6) (0,1 M)	Tris-HCl (pH 8,5) (0,1 M)
(NH ₄) ₂ SO ₄ (0,2 M)	-	Isopropanol (20%)	Li ₂ SO ₄ (0,1 M)
PEG 8000 (26%)	PEG MME 2000 (30%)	PEG 4000 (15%)	PEG 4000 (30%)

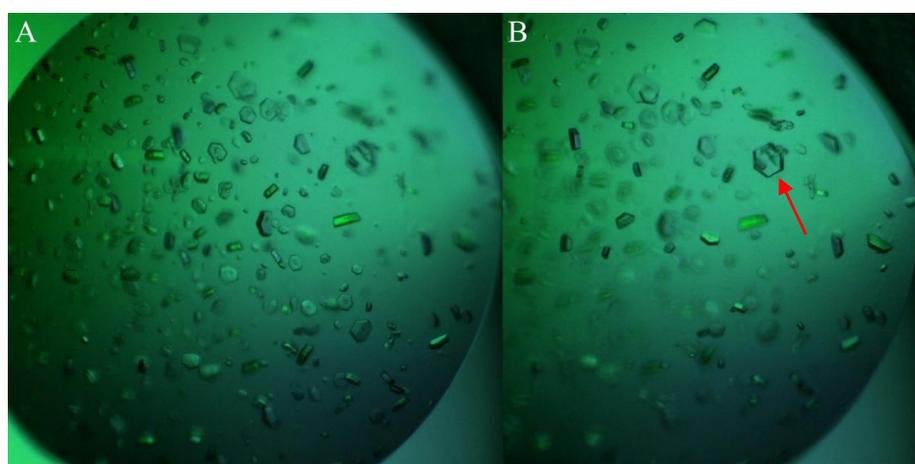


Figura 11. Evolução dos monocristais da amostra BnSP-6 nativa a 283 K. (A) Cristais obtidos após 5 dias. (B) Cristais de BnSP-6 após 21 dias. Em destaque o monocristal retirado para coleta de difração de dados de raios X.

De maneira a aprofundar o conhecimento estrutural da ativação alostérica das miotoxinas (FERNANDES *et al.*, 2014; BORGES *et al.*, 2017) e da busca do entendimento das diferenças entre um ativador e um inibidor dessas toxinas, foram realizados testes de cocrystalização da BnSP-7 e BnSP-6 com ácidos graxos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica. Assim, essas miotoxinas foram submetidas a testes de cocrystalização com ácido caprílico (8 carbonos), ácido

mirístico (14 carbonos) e ácido esteárico (18 carbonos), empregando as condições refinadas nos testes de cristalização com as proteínas nativas. Os melhores cristais foram obtidos com a amostra de BnSP-6 cristalizada na presença de ácido esteárico (BnSP-6/EsA) (Figura 12) na condição de cristalização denominada 5.4 (Tabela 7). Da mesma forma que nos testes com a BnSP-7 nativa, os testes de cocrystalização com os ácidos graxos não obtiveram sucesso, o que também pode ser solucionado com a diminuição da heterogeneidade da proteína em solução ($Pd < 15\%$). Além disso, ensaios de cocrystalização com concentrações menores de PEG nas condições podem ser mais eficientes, pela possibilidade destas moléculas apresentarem condição de competição por afinidade com os ácidos graxos, uma vez que diversas estruturas cristalográficas de miotoxinas *PLA₂-like* apresentam PEG em seus canais hidrofóbicos (DOS SANTOS *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2013; SALVADOR *et al.*, 2013; SALVADOR *et al.*, 2018).

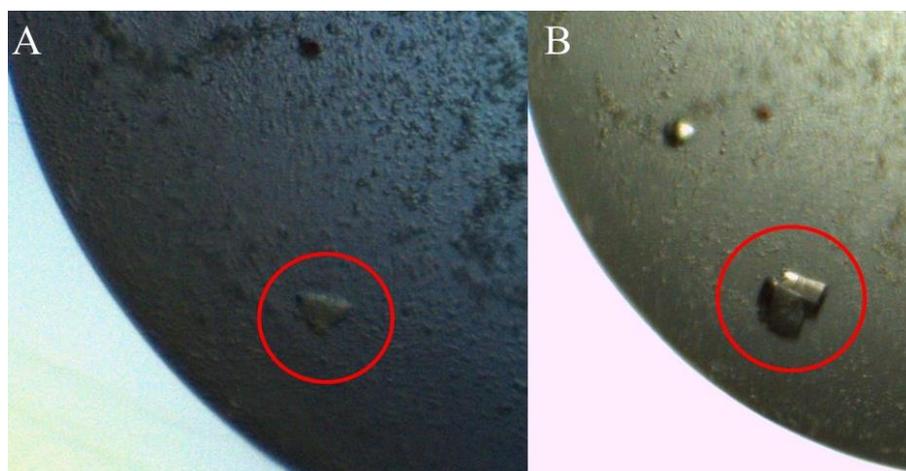


Figura 12. Crescimento do cristal de BnSP-6 cristalizada na presença de ácido esteárico (BnSP-6/EsA) a 283 K. (A) BnSP-6/EsA com 7 dias de incubação. (B) BnSP-6/EsA com 14 dias de incubação. Em destaque o monocristal retirado para coleta de difração de dados de raios X.

3.6 Processamento de dados de difração de raios X, refinamento e resolução da estrutura da BnSP-6

Dados de difração de raios X do monocristal (Figura 11B) foram coletados em um comprimento de onda de 1,459 Å, com a placa de imagens Pilatus 2M (Dectris) da linha de luz MX2 (LNLS, CNPEM, Campinas/SP). O cristal, mantido a 150 mm do detector, teve cada imagem dos pontos de difração obtida através da oscilação de 0,25° a cada 1 segundo de exposição ao feixe. Os dados processados foram realizados na resolução de 2,37 Å, com o *software* AutoPROC v.1.0.5 (VONRHEIN *et al.*, 2011). As estatísticas de coleta e processamento dos dados foram incluídas na primeira parte da Tabela 9.

A substituição molecular foi realizada utilizando como modelo a estrutura da BnSP-6 (PDB 1PC9, MAGRO *et al.*, 2003). A melhor solução encontrada pelo *software* Phaser (McCOY *et al.*, 2007) foi submetida a ciclos de refinamento no *software* PHENIX (ADAMS *et al.*, 2010). A modelagem manual e a inspeção da densidade eletrônica foram realizadas no *software* Coot (EMSLEY *et al.*, 2010). Assim, foram inseridas as moléculas de água para posteriores refinamentos restritos no *software* PHENIX. Apesar da amostra isolada através do método de Rodrigues e cols. (1998) e cedida pelo Dr. Andreimar Soares (FIOCRUZ/RO) ser identificada como a miotoxina BnSP-6, a nuvem eletrônica da estrutura elucidada no presente estudo (Figura 13) apresenta claramente em sua posição 35 a cadeia lateral de um resíduo de glutamina, conforme esperado à miotoxina BnSP-7 e não para BnSP-6 (PDB ID:1PA0; 1PC9). Assim, foi obtida uma nova versão da estrutura cristalográfica elucidada da BnSP-7 (Figura 14), referente ao homodímero na unidade assimétrica disposto na conformação dimérica denominada “alternativa” (DOS SANTOS *et al.*, 2009) ou “compacta” (BORGES *et al.*, 2017), diferentemente da estrutura anterior desta toxina disposta em dímeros “convencionais” (MAGRO *et al.*, 2003) ou “largos” (BORGES *et al.*, 2017).

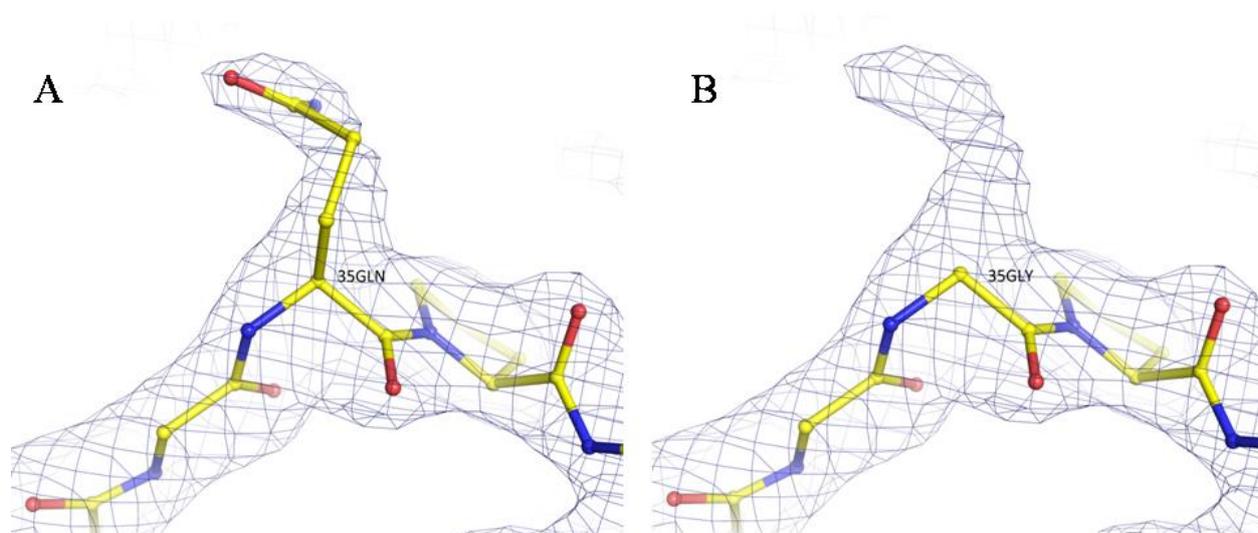


Figura 13. (A) Corte mostrando o aminoácido glutamina (GLN) na posição 35 perfeitamente ajustada com a densidade eletrônica, referindo-se a proteína BnSP-7 que possui esse aminoácido na mesma posição. (B) Corte da estrutura simulando uma glicina (GLY) na posição 35, esta, não possui a cadeia lateral que se ajustaria na densidade eletrônica mostrada.

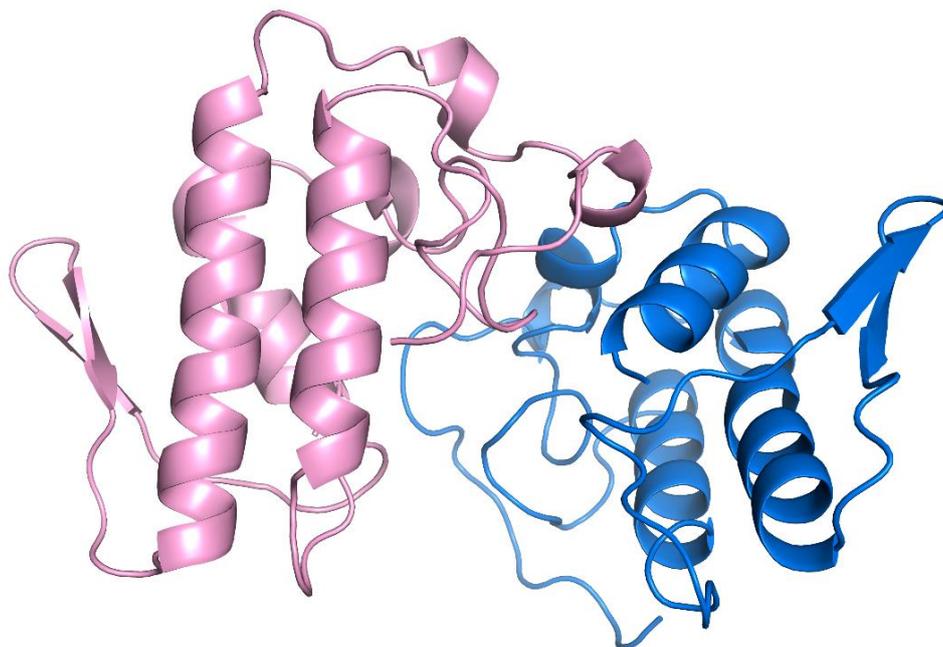


Figura 14. Estrutura cristalográfica da BnSP-7 nativa elucidada em dímero alternativo/compacto. Observa-se a diferenciação dos dois monômeros (A e B) da unidade assimétrica representados em *cartoon* (em rosa e azul).

Além das estatísticas de processamento e refinamento da estrutura cristalográfica da BnSP-7, na Tabela 8 também são informadas as estatísticas da estrutura da BnSP-6 depositada no PDB (1PC9) e da estrutura BnSP-7 (PDB ID: 1PA0), a fim de se realizar análises comparativas entre estas. Deste modo, nota-se que a BnSP-7 desse estudo, bem como a BnSP-7 e a toxina BnSP-6 (MAGRO *et al.*, 2003) isoladas pelo método de Rodrigues e cols. (1998) estão dispostas no mesmo grupo espacial ($P 3_1 2 1$), como observado frequentemente em proteínas *PLA₂-like* sem ligantes em seu canal hidrofóbico (MURAKAMI *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2010; SALVADOR *et al.*, 2017). No presente estudo, os dados foram processados e refinados com completeza máxima, inclusive na camada de maior resolução da estrutura (2,3 Å), em comparação aos cerca de 94% de completeza da estrutura original (PDB ID: 1PA0) em mesma resolução (MAGRO *et al.*, 2003), resultando então em maior informação estrutural desta proteína isolada pelo método de Rodrigues e cols. (1998).

Tabela 8. Estatísticas de processamento e refinamento dos dados de difração de raios X da BnSP-7.

	BnSP-7 *	BnSP-6 (PDB 1PC9)	BnSP-7 (PDB 1PA0)	BnSP-7/EsA
Cela unitária (Å)	a = b = 57,0; c = 129,8	a = b = 57,7; c = 130,1	a = b = 57,7; c = 130,9	a = b = 57,2; c = 130,6
Grupo espacial	P 3 ₁ 2 1			
Resolução (Å)	43,0 - 2,3 (2,4 - 2,3) ^a	30,0 - 2,5 (2,6 - 2,5) ^a	30,0 - 2,3 (2,4 - 2,3) ^a	49,5 - 2,3 (2,4 - 2,3) ^a
Reflexões únicas	10403 (1023) ^a	8429 (885) ^a	10966 (1356) ^a	10297 (1081) ^a
Completeza (%)	99,9 (100,0) ^a	91,1 (90,2) ^a	94,2 (95,9) ^a	93,3 (100,0) ^a
I/σ (I)	16,9 (2,5) ^a	8,6 (1,6) ^a	12,5 (2,2) ^a	15,5 (2,3) ^a
R _{Merge} ^b (%)	3,4 (27,2) ^a	13,6 (46,3) ^a	9,6 (64,6) ^a	8,5 (75,7) ^a
R _{Cryst} (%)	22,7 (26,9) ^a	18,6 (24,6) ^a	20,1 (24,5) ^a	22,3 (26,5) ^a
R _{Free} (%)	25,4 (22,7) ^a	25,5 (33,8) ^a	27,4 (27,9) ^a	27,4 (27,4) ^a
Número de átomos:				
▪ Proteína	1853	1864	1864	1881
▪ Água	87	228	397	81
Fator B (Å ²)	34,5	40,3	38,2	39,7
Gráfico de Ramachandran: ^c				
▪ Regiões Favoráveis (%)	96,2	89,9	91,4	94,5
▪ Regiões Permitidas (%)	2,5	10,1	8,6	4,6
▪ Regiões Não favoráveis (%)	1,3	0,0	0,0	0,8

^aNúmeros entre parênteses representam os valores da camada de mais alta resolução. ^b $R_{Merge} = \frac{\sum_{hkl} (\sum_i (|I_{hkl,i}| - I_{hkl}))}{\sum_{hkl,i} I_{hkl,i}}$, onde $I_{hkl,i}$ é a intensidade de uma medida individual de uma reflexão com índices de Miller h, k e l, e I_{hkl} é a intensidade média daquela reflexão. Calculado para $I \geq 3\sigma(I)$. ^c $R_{work} = \frac{\sum_{hkl} (|F_{obs,hkl} - F_{cal,hkl}|)}{\sum_{hkl} |F_{obs,hkl}|}$, onde $|F_{obs,hkl}|$ e $|F_{cal,hkl}|$ são as amplitudes dos fatores de estrutura observados e calculados, respectivamente. ^d R_{Free} é equivalente ao R_{Cryst} , porém calculado com 5% das reflexões omitidas do processo de refinamento. ^eCalculado pacote de programas PHENIX (ADAMS *et al.*, 2010). *Os dados da coluna denominada BnSP-7 referem-se aos dados de processamento e refinamento da estrutura cristalográfica do presente estudo.

Os dados de coleta de difração de raios X do suposto cristal de BnSP-6 (obtido na presença de ácido esteárico) foram obtidos em difratômetro Rigaku MicroMax-007HR, disponibilizado pelo Dr. Shaker Chuck Farah (Instituto de Química da Universidade de São Paulo). Seu devido processamento e refinamento mostraram que esta proteína, assim como a proteína nativa, se tratava da BnSP-7 (renomeando-a como BnSP-7/EsA) e este, não mostrou o ácido esteárico ligado ao seu canal hidrofóbico e sim uma molécula curta de PEG

(polietilenoglicol). Os dados de refinamento são mostrados na última coluna da tabela 8. Possivelmente o PEG compete com o ligante, já que outras estruturas de fosfolipases Lys-49 também apresentaram polietilenoglicol ligados ao seu canal hidrofóbico (PDB ID: 3CX1;3IQ3; 2H8I; 3T0R). Explorar novas condições e proporções de proteína/ligante para obter cristais cocrystalizados é uma perspectiva, deixando em aberto tais ideias para futuros estudos.

3.7 Atividade hemolítica indireta

O teste de hemólise indireta com eritrócitos e clara de ovo demonstrou que as proteínas BnSP-6 (N6) e BnSP-7 (N7) não possuem atividade fosfolipásica, visto que não houve a formação de halo nas perfurações testadas (Figura 15). Como já apresentado (seção 1.3) essas proteínas são enzimaticamente inativas devido a algumas mutações naturais, como a substituição do resíduo de ácido aspártico na posição 49 (Asp49) pelo resíduo de lisina (Lys), auxiliando na incapacidade de coordenação do íon Ca^{2+} (revisado por FERNANDES *et al.*, 2014). Em contraste, o veneno bruto (VB) de *B. pauloensis* apresentou um halo hemolítico translúcido de 22 mm de raio após 16 horas (Figura 15), assim como outros venenos botrópicos que também apresentaram atividade hemolítica (KETELHUT *et al.*, 2003; CARDOSO, 2003). Deste modo, a atividade hemolítica verificada com o tratamento de veneno bruto (VB) foi devida à ação catalítica das PLA₂s, com a devida formação de lisofosfolídeos como subproduto da catálise, os quais atuaram como tensoativos (surfactantes) sobre a membrana plasmática (TAN; TAN, 1988).

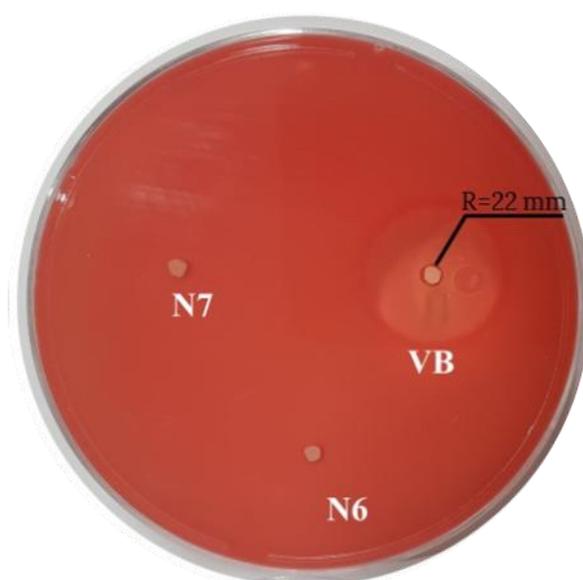


Figura 15. Atividade hemolítica indireta do veneno bruto (VB) de *Bothrops pauloensis* e das frações das toxinas BnSP-7 (N7) e BnSP-6 (N6).

3.8 Transformações de células de *E. coli* DH5 α por choque térmico

O resultado da transformação das colônias de *E. coli* pode ser visualizado na Figura 16. A placa contendo 50 μ L de células transformadas que cresceram em meio ágar com 25 μ g/mL de ZeocinaTM, foi a escolhida para a seleção de algumas colônias que foram submetidas a PCR.

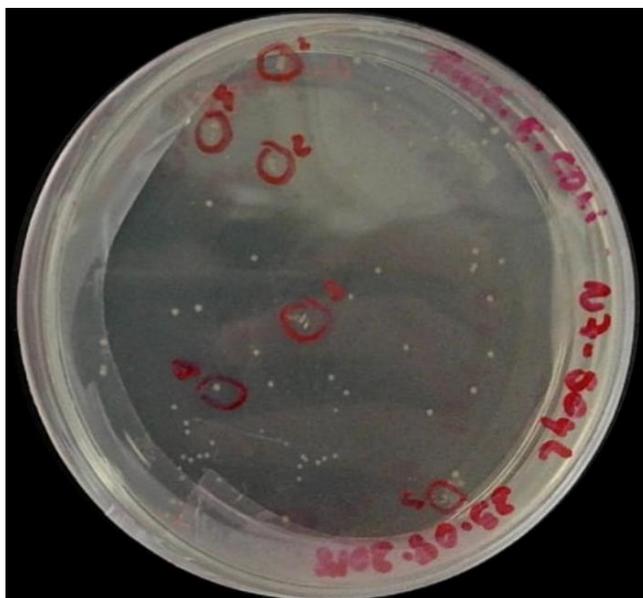


Figura 16. Placa dos transformantes de *E.coli* DH5 α contendo 25 μ g/mL de ZeocinaTM e 50 μ L de células transformadas.

3.9 Clonagem do vetor pPicZ α A-BnSP-7 em *E. coli* DH5 α competentes

Para a confirmação da inserção do vetor pPicZ α A contendo o cassete de expressão para a proteína BnSP-7, foram selecionadas 6 colônias para a extração através do *kit* PureYieldTM Plasmid Miniprep System e posterior PCR. A confirmação da sequência que codifica a proteína BnSP-7 pode ser visualizada em gel de agarose a 1% pela presença de banda com massa em pares de base compatível com o tamanho do vetor utilizado (Figura 17).

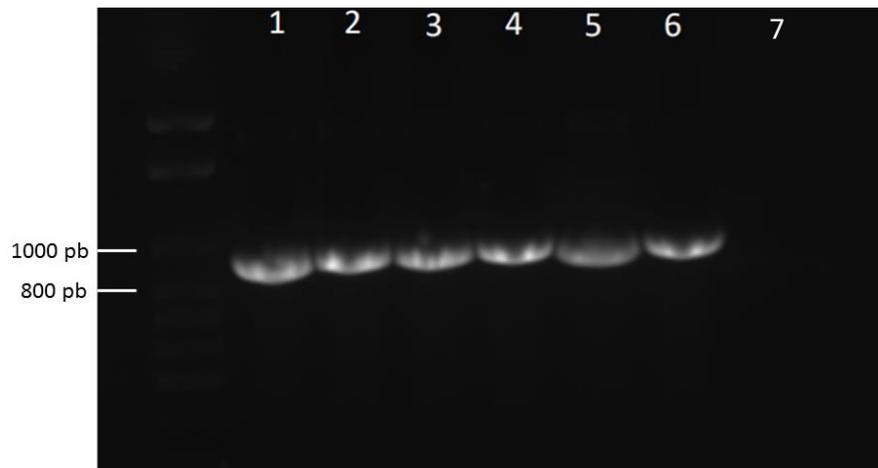


Figura 17. Eletroforese da PCR de colônia dos transformantes de *E. coli* DH5 α . Colônias numeradas de 1 a 6 contendo o vetor pPicZ α A-BnSP-7 e número 7 representando o controle negativo.

3.10 Linearização do plasmídeo pPicZ α A-BnSP-7

A reação de linearização do plasmídeo pPicZ α A contendo a sequência referente a proteína-alvo é necessária para a integração do cassete de expressão no genoma da levedura. Assim, para a digestão do plasmídeo, foi utilizado a enzima *SacI* (Invitrogen[®]). Nota-se a eficiência no processo de linearização pela diferença no tamanho das bandas do material genômico intacto e linearizado, pois nessa forma, o DNA percorre o gel com maior resistência do que um material genômico circular (Figura 18).

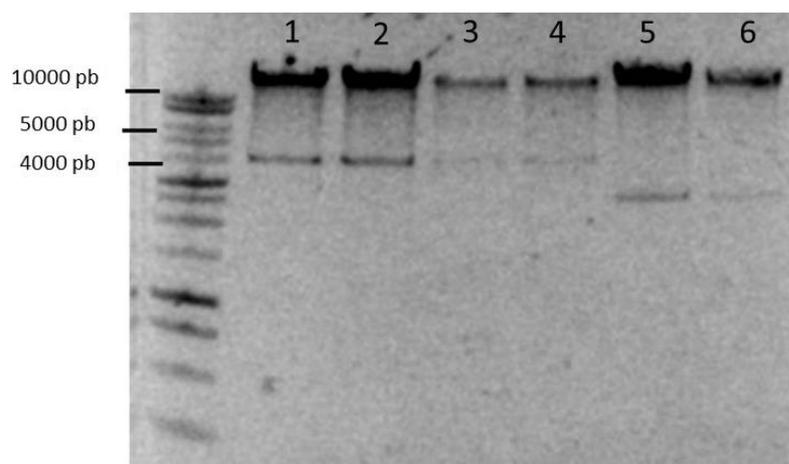


Figura 18. Eletroforese da linearização do vetor pPicZ α A-BnSP-7 com a enzima *SacI*. O gel de agarose 1% mostra bandas referentes ao material intacto (5 e 6) e linearizado (1, 2, 3 e 4), corado com SYBR[®] 22 Safe DNA Gel Stain (Invitrogen[®]).

3.11 Transformação das células competentes de *P. pastoris* por eletroporação

O vetor pPicZ α A-BnSP7 linearizado foi inserido em células competentes de *P. pastoris* por eletroporação para integração no genoma da levedura. Após a transformação, as células de *P. pastoris* foram cultivadas em meio contendo 100 e 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ZeocinaTM para seleção de colônias resistentes (Figura 19). Todas as placas cultivadas cresceram colônias, tanto as placas contendo as células que foram purificadas direto do gel contendo o vetor linearizado (estratégia 1 do item 2.3.8) quanto as células preparadas com a estratégia 2 do item 2.3.8. Até então, todas as colônias possivelmente estariam transformadas contendo o vetor pPicZ α A-BnSP-7.

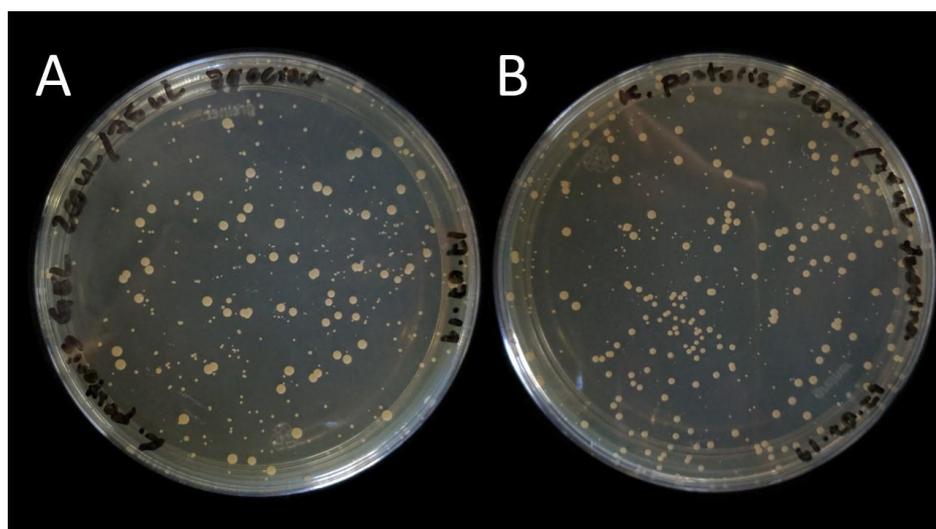


Figura 19. Placa dos transformantes em KM71H. As placas contêm 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ZeocinaTM, indicando a presença de colônias positivas para o inserto referente a BnSP-7 recombinante tanto na estratégia 1 (A) quanto na estratégia 2 (B) de preparação do plasmídeo linearizado.

3.12 PCR de colônia dos transformantes de *P. pastoris* e testes de viabilidade do antibiótico e das células de *P. pastoris* KM71H

Visto que as colônias de *P. pastoris* cresceram nas placas contendo variações de concentração de ZeocinaTM, foi necessário a confirmação do plasmídeo no genoma da levedura por PCR. Assim, as colônias escolhidas foram submetidas à lise por dois protocolos (item 2.3.11) visando a certeza de que as células eucarióticas seriam lisadas para expor o material genético e assim visualizar a confirmação no gel de agarose 1% após a reação em cadeia de polimerase.

Porém, não foi confirmada a inserção do vetor nas células da levedura, pois no gel não apareceu as bandas referentes a seqüência da proteína-alvo contida no vetor pPicZ α A-BnSP-7 (resultados não mostrados). Inicialmente, pensava-se que as células da levedura não foram lisadas, por se tratar de uma célula superior (eucarioto) de difícil lise. Então essa etapa foi

repetida várias vezes, visando um cuidado maior a cada passo: na preparação das soluções, pipetagem, tempo e materiais utilizados. Todas as etapas foram revisadas com o intuito de achar onde estaria a possível resposta para a não visualização da sequência da proteína-alvo no gel da PCR das células transformadas de *P. pastoris*, já que nas placas contendo alta concentração do antibiótico (no qual o vetor tem resistência) cresceram várias colônias. Para tanto, surgiram duas dúvidas: (1) o antibiótico utilizado no trabalho; e (2) as células originais da levedura *P. pastoris* linhagem KM71H.

O antibiótico Zeocina™ estava condicionado a -20 °C no laboratório, e este, era utilizado para outros trabalhos de expressão heteróloga do grupo há alguns anos. Para testar se o antibiótico ainda estava viável, foram feitos alguns testes com a bactéria *E. coli* original, ou seja, células que não continham o vetor de resistência a Zeocina™. Os meios continham concentrações diferentes de células e de antibiótico, em todas as concentrações cresceram a bactéria. Concluiu-se então que o antibiótico, por estar muito tempo armazenado, poderia ter sido submetido a algumas falhas no armazenamento e manuseio, já que a Zeocina™ é extremamente sensível a temperaturas, condições salinas e luminosidade (de acordo com o fabricante).

Dessa forma, foi adquirido um novo lote de Zeocina™ pela empresa Invitrogen®, e todo o procedimento de expressão foi refeito. Porém, ao chegar à etapa da PCR dos transformantes de levedura, o gel de agarose não apresentava bandas com a sequência BnSP-7 do vetor pPicZαA-BnSP-7, mesmo apresentando colônias (dos transformantes em levedura) nas placas que continham concentrações diferentes do antibiótico. Novamente testes de viabilidade do antibiótico foram feitos para descartar a possibilidade de o novo antibiótico estar ineficiente para os procedimentos da proteína recombinante. Primeiramente foram plaqueadas células de *E. coli* original em diferentes volumes em meio ágar contendo diferentes concentrações da nova Zeocina™. Os resultados são mostrados a seguir (Figura 20).

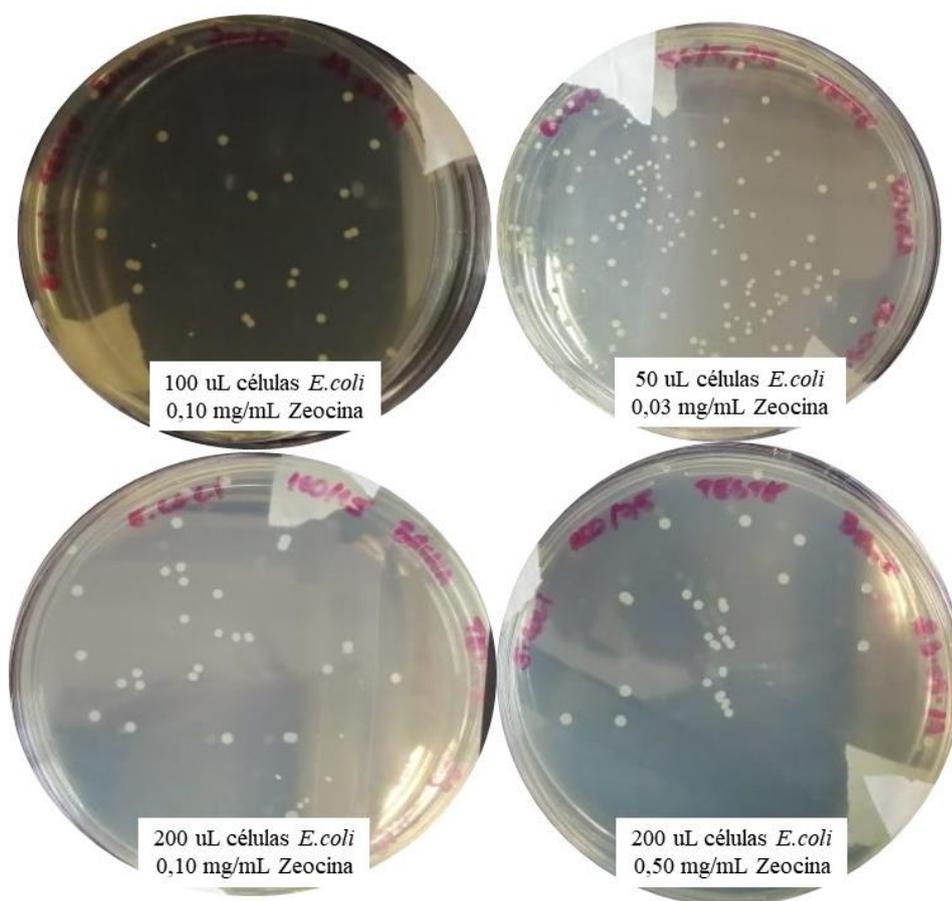


Figura 20. Placas contendo células de *E. coli* original em diferentes concentrações do antibiótico Zeocina™.

É possível visualizar colônias de bactérias em todas as concentrações do antibiótico. Assim, foi feito outro teste em meio líquido, para descartar a possibilidade de o antibiótico ter sido afetado pela temperatura do meio ágar quando inoculado. Como parâmetros foram utilizados outros dois antibióticos, a Canamicina e o Cloranfenicol, ambos muito utilizados em experimentos de expressão heteróloga em bactéria *E. coli* (DE SOUZA *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2010; WU, 2019). Os resultados são apresentados nas Figuras 21, 22 e 23.

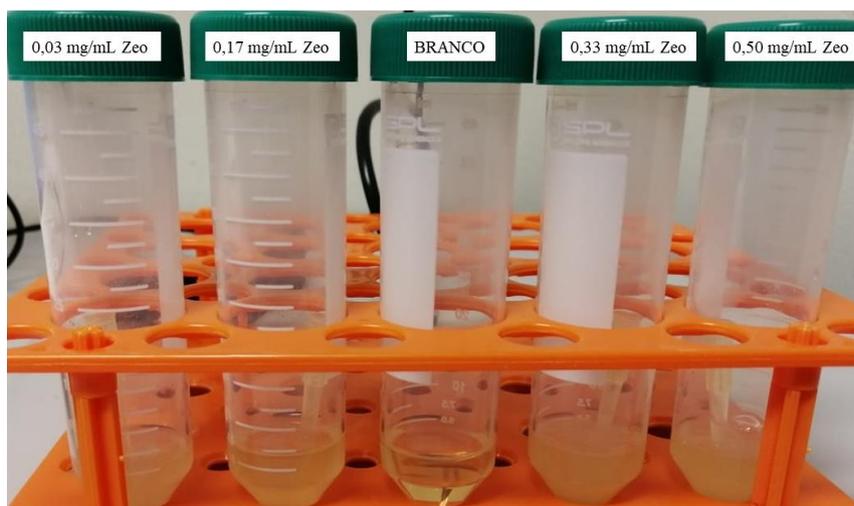


Figura 21. Tubos contendo bactérias em diferentes concentrações de Zeocina™ após 16 horas de incubação a 37 °C.

É possível identificar crescimento de bactérias (meio turvo) em todas as concentrações do antibiótico Zeocina™ na Figura 21 comparando-as com o branco.

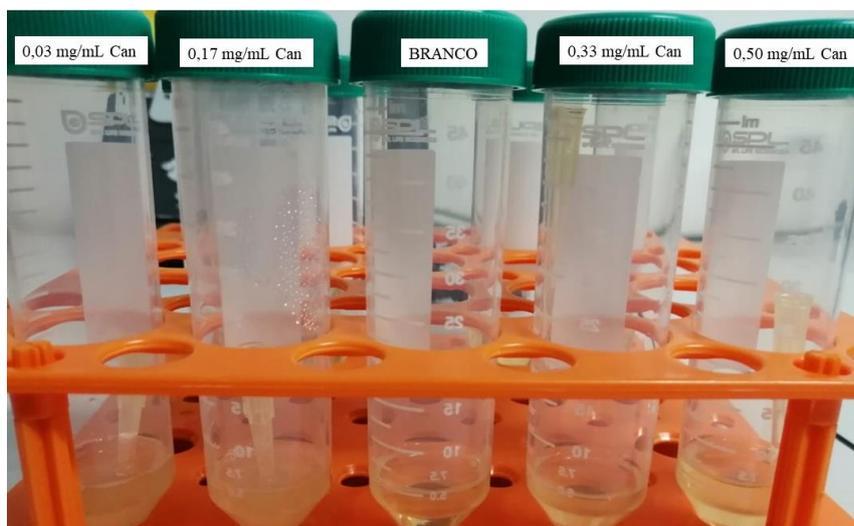


Figura 22. Tubos contendo bactérias em diferentes concentrações de Canamicina.

Ao analisar a Figura 22, a atenção é direcionada aos tubos contendo as concentrações de 0,33 mg/mL e 0,50 mg/mL do antibiótico Canamicina. Nestes, ocorreu o esperado pouco ou nulo crescimento de bactérias, pois em altas concentrações do antibiótico o crescimento de bactérias é quase impossível.

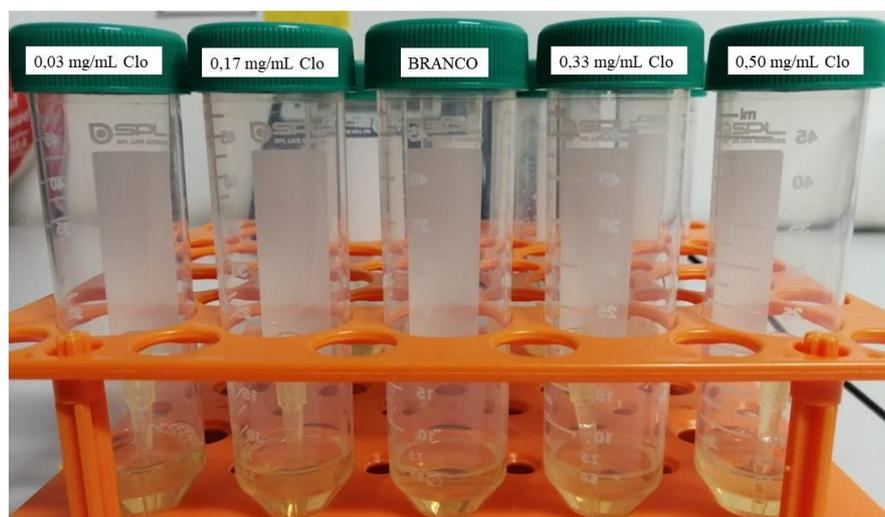


Figura 23. Tubos contendo bactérias em diferentes concentrações de Cloranfenicol.

Os resultados apresentados no teste com o antibiótico Cloranfenicol (Figura 23) demonstram que praticamente não houve crescimento de bactérias em nenhuma concentração do antibiótico comparando-os com o tubo controle (branco).

Esses testes foram realizados com o intuito de apresentar a empresa da qual foi adquirido o antibiótico ZeocinaTM, a ineficiência do mesmo para o experimento alvo desse estudo. Os outros antibióticos foram utilizados como comparação para o relatório enviado à empresa.

A segunda dúvida levantada a partir dos resultados obtidos da expressão heteróloga, foi sobre as células originais da levedura metilotrófica *P. pastoris*. No decorrer das tentativas, foi observado que na etapa de preparação das células KM71H para receber o vetor por eletroporação, essas células cresciam de modo exagerado, chegando a DO a A_{600} exigida para a eletroporação com um tempo muito inferior ao esperado. Tentativas de fazer uma curva logaritmo de crescimento do pré-inóculo foram falhas, pois o crescimento não seguia parâmetros estáveis de tempo e densidade óptica. As células originais de *P. pastoris* linhagem KM71H vieram da Universidade Federal de Uberlândia, e estavam armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ há alguns anos no laboratório. Surgiu a questão de contaminação dessas células por outros microrganismos pelo fato do rápido crescimento na preparação do pré-inóculo. Assim alguns testes foram realizados em parceria com a Prof^a. Dr^a. Sandra de Moraes do Departamento de Microbiologia e Imunologia no Instituto de Biociências da UNESP com a finalidade da confirmação de contaminantes nas células de levedura.

Foram avaliadas 3 células diferentes semeadas em placas de Petri: (I) células da placa original de *P. pastoris* KM71H, (II) células repicadas da placa original de *P. pastoris* KM71H que cresceram em forma de “tapete” e (III) células da placa de *P. pastoris* transformadas que supostamente estariam com o vetor pPicZ α A-BnSP-7 (pois cresceram no meio contendo

Zeocina™). Os resultados são apresentados nas imagens das lâminas após a coloração de Gram na Figura 24.

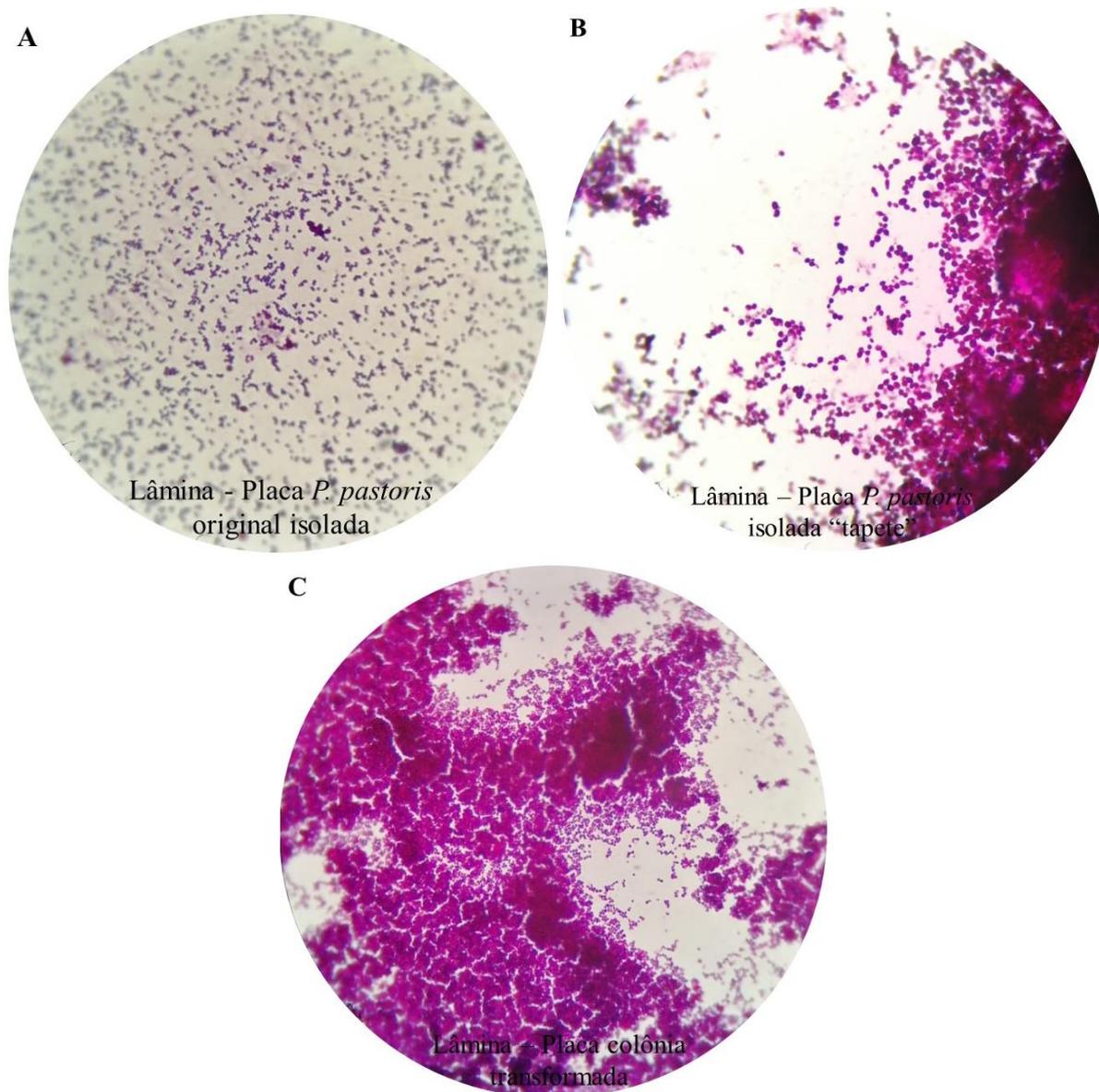


Figura 24. Lâminas de coloração de Gram. (A) Lâmina da placa original de *P. pastoris* KM71H, (B) Lâmina da placa repicada das células originais de *P. pastoris* crescidas em forma de "tapete" e (C) Lâmina da placa contendo células KM71H supostamente transformadas.

Na Figura 24, é possível visualizar em todas as lâminas cocos em formato de cachos, característico de bactérias do gênero *Staphylococcus*, confirmando assim, a presença de outros microrganismos nas células originais e transformadas da levedura *P. pastoris*. Corroborando também, com a ineficiência do antibiótico Zeocina™ na placa dos transformantes, no qual não foi seletivo às colônias de leveduras que supostamente estariam com o gene de resistência a este.

Porém, também é visualizado nas lâminas, células características de levedura, em processo de divisão assimétrica chamado de brotamento. Essas células estão em menores quantidades na lâmina, por esse motivo, decidimos isolar a levedura em um meio recomendado para o cultivo, isolamento e identificação de fungos patogênicos e leveduras denominado ágar *Sabouraud* (Figura 25). Dessa maneira, os experimentos futuros de expressão em *P. pastoris* linhagem KM71H seriam realizados apenas com essas células puras e isoladas.



Figura 25. Placa contendo cultura pura de *P. pastoris* KM71H.

Capítulo 4:

Conclusões

Conclusões e perspectivas futuras

É possível pontuar algumas considerações acerca dos estudos realizados. Primeiramente ressalta-se a importância dos estudos cristalográficos bem como outras técnicas biofísicas que auxiliam na compreensão do funcionamento de várias macromoléculas biológicas. No presente estudo, através dessas técnicas, procurou-se corroborar com o atual mecanismo de ação das proteínas PLA₂-like, assim como explorar possíveis inibidores e/ou ativadores dessas toxinas. Pela técnica de cristalografia, foi possível identificar que a amostra de BnSP-6 isolada pelo método original se tratava da BnSP-7. Conclui-se que a técnica de cristalização provavelmente serviu como uma etapa adicional de purificação da fração do veneno. Em relação às diferenças encontradas entre os métodos de purificação do veneno é possível sugerir que devido ao caminho evolutivo da espécie *Bothrops pauloensis* foi obtida a observada diversidade proteômica do veneno. Deste modo, torna-se necessária a contínua exploração e identificação do padrão venômico das espécies e subespécies de serpentes, levando em consideração suas características filogenéticas e geográficas.

Com o veneno dos espécimes de *B. pauloensis* de Morungaba/SP, não foi possível informar a exata identidade das proteínas PLA₂-like fracionadas pelos experimentos de espectrometria de massas, devido ao insucesso na detecção e/ou ionização de peptídeos (de apenas 3 resíduos) do único aminoácido diferencial entre as miotoxinas BnSP-6 e BnSP-7, o qual está situado entre duas zonas de clivagem/digestão pela tripsina (resíduos de lisina e arginina). Assim, diferentes abordagens ainda são necessárias à devida identificação das isoformas, tais como digestões em diferentes pontos de clivagem e sequenciamento *de novo*, com subsequente melhoramento dos bancos de dados disponíveis.

O desenvolvimento da porção biotecnológica deste estudo evidenciou a necessidade da realização de testes de qualidade e integridade dos insumos de cada etapa do processo de expressão heteróloga, denotando a complexidade deste processo. Deste modo, todas as etapas críticas foram detectadas à devida obtenção de miotoxinas PLA₂-like (BnSP-7) em levedura (*Pichia pastoris*). Conseqüentemente haverá diminuição dos custos na obtenção de miotoxinas ofídicas de baixo rendimento em purificações do veneno bruto (e maior oferta deste material para diferentes estudos/aplicações), além da possibilidade de alterações (mutações sítio-dirigidas) na proteína, seja para fins de elucidação de mecanismos de ação ou diferentes aplicações biotecnológicas/terapêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, P. D.; AFONINE, P. V.; BUNKÓCZI, G.; CHEN, V. B.; DAVIS, I. W.; ECHOLS, N.; HEADD, J. J.; HUNG, L. W.; KAPRAL, G. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; MCCOY, A. J.; MORIARTY, N. W.; OEFFNER, R.; READ, R. J.; RICHARDSON, D. C.; RICHARDSON, J. S.; TERWILLIGER, T. C.; ZWART, P. H. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 213–221, 2010.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANGULO, Y.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Myotoxic phospholipases A2 in Bothrops snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from Bothrops jararacussu. **Biochimie**, [s. l.], v. 82, n. 8, p. 755–763, 2000.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A2 - A structural review. **Toxicon**, [s. l.], v. 34, n. 8, p. 827–841, 1996.

AZEVEDO, F. V. P. V.; LOPES, D. S.; CIRILO GIMENES, S. N.; ACHÊ, D. C.; VECCHI, L.; ALVES, P. T.; GUIMARÃES, D. de O.; RODRIGUES, R. S.; GOULART, L. R.; RODRIGUES, V. de M.; YONEYAMA, K. A. G. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA2 homologue from Bothrops pauloensis venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 82, p. 671–677, 2016.

BAKIR, M.; ÇERIKCIOĞLU, N.; TIRTIR, A.; BERRAK, S.; ÖSEK, E.; CANPOLAT, C. Pichia anomala fungaemia in immunocompromised children. **Mycoses**, [s. l.], v. 47, n. 5–6, p. 231–235, 2004.

BELLUOMINI, H. E.; WAKAMATSU, C. T.; LUCAS, S.M. & CARDOSO, J. L. C. Acidentes do trabalho por animais peçonhentos. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, 15:38-42. 1987.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Recording of venomous bites and stings by National Information Systems in Brazil. **Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 735–746, 2002.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. **Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 7–16, 2003.

BORGES, I. P.; CASTANHEIRA, L. E.; BARBOSA, B. F.; DE SOUZA, D. L. N.; DA SILVA, R. J.; MINEO, J. R.; TUDINI, K. A. Y.; RODRIGUES, R. S.; FERRO, E. A. V.; DE MELO RODRIGUES, V. Anti-parasitic effect on *Toxoplasma gondii* induced by BnSP-7, a Lys49-phospholipase A 2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **Toxicon**, [s. l.], v. 119, p. 84–91, 2016.

BORGES, I. P.; SILVA, M. F.; SANTIAGO, F. M.; DE FARIA, L. S.; JÚNIOR, Á. F.; DA SILVA, R. J.; COSTA, M. S.; DE FREITAS, V.; YONEYAMA, K. A. G.; FERRO, E. A. V.; LOPES, D. S.; RODRIGUES, R. S.; DE MELO RODRIGUES, V. Antiparasitic effects induced by polyclonal IgY antibodies anti-phospholipase A 2 from *Bothrops pauloensis* venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 112, p. 333–342, 2018.

BORGES, R. J.; CARDOSO, F. F.; FERNANDES, C. A. H.; DREYER, T. R.; DE MORAES, D. S.; FLORIANO, R. S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; FONTES, M. R. M. Functional and structural studies of a Phospholipase A2-like protein complexed to zinc ions: Insights on its myotoxicity and inhibition mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [s. l.], 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Secretaria de vigilância em saúde**. v.50, n.11, Mar, 2019.

BROWN, T.A. Clonagem Gênica e análise de DNA: uma introdução. Porto Alegre, **Artmed**, 240p. 4ed. 2003.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. **Phospholipase A2 biochemistry**, 2009.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: Um guia prático. **Química Nova**, [s. l.], 2008.

CARDOSO JLC, FRANÇA FOS, WEN FH, MÁLAQUE CMS, HADDAD Jr. V. Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. **Sarvier**, São Paulo, 2003.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. Venomous animals in Brazil: biology, clinic and therapeutics of envenomations. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 338–338, 2003.

CARDOSO, F. F.; BORGES, R. J.; DREYER, T. R.; SALVADOR, G. H. M.; CAVALCANTE, W. L. G.; PAI, M. D.; GALLACCI, M.; FONTES, M. R. M. Structural basis of phospholipase A2-like myotoxin inhibition by chicoric acid, a novel potent inhibitor of ophidian toxins. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [s. l.], 2018.

CARDOSO, F.F.; GOMES, A.A.S.; DREYER, T.R.; CAVALCANTE, W.L.G.; DAL PAI, M.; GALLACCI, M.; FONTES, M.R.M. Neutralization of a bothropic PLA₂-like protein by caftaric acid, a novel potent inhibitor of ophidian myotoxicity. *Biochimie*, v.170, p.163-172, 2020.

CARRASCO, P. A.; MATTONI, C. I.; LEYNAUD, G. C.; SCROCCHI, G. J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 109–124, 2012.

CARVALHO, P. C.; LIMA, D. B.; LEPREVOST, F. V; SANTOS, M. D. M.; FISCHER, J. S. G.; AQUINO, P. F.; MORESCO, J. J.; III, J. R. Y.; VALMIR, C. Shotgun Proteomic Data. **Nat Protoc.**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 102–117, 2017.

CEDRO, R. C. A.; MENALDO, D. L.; COSTA, T. R.; ZOCCAL, K. F.; SARTIM, M. A.; SANTOS-FILHO, N. A.; FACCIOLI, L. H.; SAMPAIO, S. V. Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A2 from Bothrops jararaca snake venom Suely V. Sampaio, Eliane C. Arantes, Marco A. Sartim. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 1–14, 2018.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 24, 2000.

CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 1102–1107, 2012.

CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H. C.; RULLER, R.; SÁ, J. M.; WARD, R. J. Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A2. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 366, n. 3, p. 971–976, 2002.

CLEMENT, H.; CORZO, G.; NERI-CASTRO, E.; ARENAS, I.; HAJOS, S.; DE ROODT, A. R.; VILLEGAS, E. cDNA cloning, heterologous expression, protein folding and immunogenic properties of a phospholipase A2 from Bothrops ammodytoides venom. **Protein Expression and Purification**, [s. l.], v. 154, n. September 2018, p. 33–43, 2019.

CONESA, A.; PUNT, P. J.; VAN LUIJK, N.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. **The secretion pathway in filamentous fungi: A biotechnological view**, 2001.

COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; OLIVEIRA, C. Z.; SANTOS-FILHO, N. A.; TEIXEIRA, S. S.; NOMIZO, A.; FULY, A. L.; MONTEIRO, M. C.; DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S.; STÁBELI, R. G.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Myotoxic phospholipases A2 isolated from Bothrops brazili snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, [s. l.], v. 29, n. 10, p. 1645–1656, 2008.

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 23–52, 2000.

CREGG, J. M. (Ed.) **Methods in Molecular Biology**. 2nd. Totowa, NJ. Humana Press. *Pichia* Protocols. 2007.

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 119–138, 2005.

DAMASCENO, L. M.; HUANG, C. J.; BATT, C. A. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 93, n. 1, p. 31–39, 2012.

DELOITTE TOUCHE TOHMATSU, Limited. Global life sciences outlook: moving forward with cautions optimism. **Report**, 2016.

DE SOUZA, F. G.; ANA, A. L. A.; CSORDAS, B. G.; PRADO, R. Q.; ELISEI, C.; SOARES, C. O.; ARAÚJO, F. R.; ROSINHA, S. P. F. Desenvolvimento e avaliação de uma cepa knockout de *Brucella abortus* obtida pela deleção do gene *virB10*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 29, n. 11, p. 943–950, 2009.

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

DENNIS, E. A.; CAO, J.; HSU, Y. H.; MAGRIOTI, V.; KOKOTOS, G. **Phospholipase A2 enzymes: Physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention**. [s.l: s.n.]. v. 111. 2011.

DOS SANTOS, J. I.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A2 from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **Journal of Structural Biology**, [s. l.], 2009.

DOS SANTOS, J. I.; CARDOSO, F. F.; SOARES, A. M.; DAL PAI SILVA, M.; GALLACCI, M.; FONTES, M. R. M. Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: New insights into Lys49-PLA 2 inhibition. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 12, 2011.

EMSLEY, P.; LOHKAMP, B.; SCOTT, W. G.; COWTAN, K. Features and development of Coot. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 486–501, 2010.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET, R. L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, [s. l.], v. 156, n. 3, p. 617–640, 2009.

FERNANDES, T. A.; AGUAR, C.N.; DAHER, E. F. Envenenamento crotálico: epidemiologia, insuficiência renal aguda e outras manifestações clínicas. **Revista eletrônica pesquisa Médica**,

v.2, n. 2, p. 235-253, 2008.

FERNANDES, C. A. H.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SALVADOR, G. M.; SILVA, M. C. O.; COSTA, T. R.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA₂s. **Journal of Structural Biology**, [s. l.], 2010.

FERNANDES, C. A. H.; COMPARETTI, E. J.; BORGES, R. J.; HUANCAHUIRE-VEGA, S.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Structural bases for a complete myotoxic mechanism: Crystal structures of two non-catalytic phospholipases A₂-like from Bothrops brazili venom. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [s. l.], 2013.

FERNANDES, C. A. H.; BORGES, R. J.; LOMONTE, B.; FONTES, M. R. M. **A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A₂-like proteins from viperid snake venoms**, 2014.

FERNANDES, C. A. H.; CARDOSO, F. F.; CAVALCANTE, W. G. L.; SOARES, A. M.; DAL-PAI, M.; GALLACCI, M.; FONTES, M. R. M. Structural basis for the inhibition of a phospholipase A₂-like toxin by caffeic and aristolochic acids. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1–19, 2015.

FERRÉ-D'AMARÉ, A. R.; BURLEY, S. K. Dynamic light scattering in evaluating crystallizability of macromolecules. **Methods in Enzymology**, [s. l.], v. 276, n. 1993, p. 157–166, 1997.

FONTES, M. R. M.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; FERNANDES, A. C.; DA SILVA, R. J.; GIGLIO, J. R. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a myotoxic phospholipase A₂ homologue from Bothrops neuwiedi pauloensis venom. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s. l.], v. 1432, n. 2, p. 393–395, 1999.

GIULIANI, C. D.; IEMMA, M. R. C.; BONDIOLI, A. C. V.; SOUZA, D. H. F.; FERREIRA, L. L.; AMARAL, A. C.; SALVINI, T. F.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Expression of an active recombinant lysine 49 phospholipase A2 myotoxin as a fusion protein in bacteria. **Toxicon**, [s. l.], v. 39, n. 10, p. 1595–1600, 2001.

GONÇALVES, A. M.; PEDRO, A. Q.; MAIA, C.; SOUSA, F.; QUEIROZ, J. A.; PASSARINHA, L. A. *Pichia pastoris*: A recombinant microfactory for antibodies and human membrane proteins. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 587–601, 2013.

GUIMARAES, C.; MOREIRA-DILL, L.; FERNANDES, R.; COSTA, T.; HAGE-MELIM, L.; MARCUSSI, S.; CARVALHO, B.; SILVA, S.; ZULIANI, J.; FERNANDES, C.; CALDERON, L.; SOARES, A.; STABELI, R. Biodiversity as a Source of Bioactive Compounds Against Snakebites. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 21, n. 25, p. 2952–2979, 2014.

GUTIÉRREZ, J.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 411–413, 1988.

GUTIÉRREZ, J.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from Bothrops snake venoms. **Toxicon**, [s. l.], v. 33, n. 11, p. 1405–1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A 2: Insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 915–931, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. **PLoS Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 0727–0731, 2006.

GUTIÉRREZ, J. M.; WILLIAMS, D.; FAN, H. W.; WARRELL, D. A. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, [s. l.], v. 56, n. 7, p. 1223–1235, 2010.

HAWDOOD, B.J. Pioneers of anti-venomous serotherapy: Dr Vital Brazil (1865-1950).

Toxicon, v. 30(5-6):573-9. 65, 1992.

HEINRIKSON, R. L.; KRUEGER, E. T.; KEIM, P. S. Amino acid sequence of phospholipase A2 from the venom of {*Crotalus adamanteus*}. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 252, n. 14, p. 4913–4921, 1977.

HOFMANN, A. Spectroscopic techniques: I Spectrophotometric techniques. In: WILSON, K. & WALKER J. (Ed.), *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, Cambridge University Press, Cambridge, 2010.

IZIDORO, L. F. M.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES, R. S.; FERRO, E. V.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). **Biochimie**, [s. l.], v. 85, n. 7, p. 669–675, 2003.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; DE SILVA, H. J. **The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths**, 2008.

KETELHUT, D. F. J.; HOMEM DE MELLO, M.; VERONESE, E. L. G.; ESMERALDINO, L. E.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R.; CINTRA, A. C. O.; SAMPAIO, S. V. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A2 isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, [s. l.], v. 85, n. 10, p. 983–991, 2003.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. **Phospholipase A2 enzymes**. [s.l: s.n.]. v. 68–69. 2002.

KURTZMAN, C. P. Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 973–976, 2005.

KURTZMAN, C. P. Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are

Komagataella phaffii as determined from multigene sequence analysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 36, n. 11, p. 1435–1438, 2009.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-5. 1970.

LEITE, R.S. **Efeito de uma Fosfolipase A2 Lisina49, ACL miotoxina, do veneno da serpente Agkistrodon contortrix laticinctus sobre o transporte de água em bexiga urinária isolada de sapo.** Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

LIANG, N. S.; PUNGERČAR, J.; KRIŽAJ, I.; ŠTRUKELJ, B.; GUBENŠEK, F. Expression of fully active ammodytoxin A, a potent presynaptically neurotoxic phospholipase A2, in Escherichia coli. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 334, n. 1, p. 55–59, 1993.

LIMA, L. F. G.; BORGES, R. J.; VIVIESCAS, M. A.; FERNANDES, C. A. H.; FONTES, M. R. M. Structural studies with BnSP-7 reveal an atypical oligomeric conformation compared to phospholipases A2-like toxins. **Biochimie**, [s. l.], v. 142, p. 11–21, 2017.

LIU, C.S.; KUO, P.Y.; CHEN, J.M. et al. Primary structure of an inactive mutant of phospholipase A2 in the venom of Bungarus fasciatus (banded krait). **J Biochem** 112: 707-13, 1992.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. **An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action**, 2003.

LUNA, K. P. O.; DA SILVA, M. B.; PEREIRA, V. R. A. Clinical and immunological aspects of envenomations by Bothrops snakes. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 130–141, 2011.

MAGRO, A. J.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A 2: Quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 311, n. 3, p. 713–720, 2003.

MARAGANORE, J. M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W.; KÉZDY, F. J.; HEINRIKSON, R. L. A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 259, n. 22, p. 13839–13843, 1984.

MARKIDES, S. C. <1996 Savvas Makrides, Microb Rev 60 (3).pdf>. **Microbiological Reviews**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 512–538, 1996.

MARCHI-SALVADOR, D. P.; FERNANDES, C. A. H.; SILVEIRA, L. B.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Crystal structure of a phospholipase A2 homolog complexed with p-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [s. l.], v. 1794, n. 11, p. 1583–1590, 2009.

MARSTON, F. A. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in Escherichia coli. **The Biochemical journal**, [s. l.], v. 240, n. 1, p. 1–12, 1986.

MCCARROLL, L.; KING, L.A. Stable insect cell cultures for recombinant protein production. **Curr Opin Biotechnol** 8:590-594. 1997.

MCCOY, A. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ADAMS, P. D.; WINN, M. D.; STORONI, L. C.; READ, R. J. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 658–674, 2007.

MCPHERSON, A. Introduction to Macromolecular Cristallography. **Hoboken: Wiley Liss**.2003.

MEBS, D.; KUCH, U.; CORONAS, F. I. V.; BATISTA, C. V. F.; GUMPRECHT, A.; POSSANI, L. D. Biochemical and biological activities of the venom of the Chinese pitviper *Zhaoermia mangshanensis*, with the complete amino acid sequence and phylogenetic analysis of a novel Arg49 phospholipase A2 myotoxin. **Toxicon**, [s. l.], v. 47, n. 7, p. 797–811, 2006.

MURAKAMI, M. T.; VIÇOTI, M. M.; ABREGO, J. R. B.; LOURENZONI, M. R.; CINTRA, A. C. O.; ARRUDA, E. Z.; TOMAZ, M. A.; MELO, P. A.; ARNI, R. K. Interfacial surface charge

and free accessibility to the PLA2-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA2 homologues. **Toxicon**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 378–387, 2007.

NARANJO, C. A.; JIVAN, A. D.; VO, M. N.; DE SA CAMPOS, K. H.; DEYARMIN, J. S.; HEKMAN, R. M.; URIBE, C.; HANG, A.; HER, K.; FONG, M. M.; CHOI, J. J.; CHOU, C.; RABARA, T. R.; MYERS, G.; MOUA, P.; THOR, D.; RISSER, D. D.; VIERRA, C. A.; FRANZ, A. H.; LIN-CEREGHINO, J.; LIN-CEREGHINO, G. P. Characterization of the Role of BGS13 in the Secretory Mechanism of *Pichia pastoris*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], n. October, 2019.

OGAWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y.; OHNO, M. Evidence for functional involvement of asparagine 67 in substrate recognition by snake venom phospholipases A2. **Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 122, n. 5, p. 955–960, 1997.

OTAG, F.; KUYUCU, N.; ERTURAN, Z.; SEN, S.; EMEKDAS, G.; SUGITA, T. An outbreak of *Pichia ohmeri* infection in the paediatric intensive care unit: Case reports and review of the literature. **Mycoses**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 265–269, 2005.

OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.; BEATRIZ MESA, M.; DUQUE, E.; RODRÍGUEZ, O.; LUIS ARANGO, J.; GÓMEZ, F.; TORO, A.; CANO, F.; MARÍA RODRÍGUEZ, L.; CARO, E.; MARTÍNEZ, J.; CORNEJO, W.; MARIANO GÓMEZ, L.; LUIS URIBE, F.; CÁRDENAS, S.; NÚÑEZ, V.; DÍAZ, A. Complications of Bothrops, Porthidium, and Bothriechis snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, [s. l.], v. 40, n. 8, p. 1107–1114, 2002.

PIEIDADE, G. B.; SILVA, F. M. de S.; SHIMADA C. M.; ALMEIDA, A. M. Correspondências administrativas do Instituto Butantan: ofícios e cartas expedidos de 1900 a 1905. **Biblioteca Instituto Butantan**, p.93-114, São Paulo, 2015.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista Associação Médica do Brasil**. Goiás. v. 47, n.1, p. 9-24, 2001.

PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A.; STAFFORINI, D. M.; MCINTYRE, T. M. Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], 2000.

RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B. W. A comparison of the crystal structure of phospholipase A2 from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 260, n. 21, p. 11627–11634, 1985.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 475–480, 1997.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R. m.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: Biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, [s. l.], v. 121, n. 3, p. 215–222, 1998.

RODRIGUES, R. S.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F. P. P.; DE LA TORRE, P.; HENRIQUE-SILVA, F.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; RODRIGUES, V. M. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**, [s. l.], 2012.

ROJAS, E.; QUESADA, L.; ARCE, V.; LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M. Neutralization of four Peruvian *Bothrops* sp. snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Perú and Costa Rica: Preclinical assessment. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 93, n. 1, p. 85–95, 2005.

SÁ, J. M.; CHIOATO, L.; FERREIRA, T. L.; DE OLIVEIRA, A. H. C.; RULLER, R.; ROSA, J. C.; GREENE, L. J.; WARD, R. J. Topology of the substrate-binding site of a Lys49-phospholipase A2 influences Ca²⁺-independent membrane-damaging activity. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 382, n. 1, p. 191–198, 2004.

SALVADOR, G. H. M.; FERNANDES, C. A. H.; MAGRO, A. J.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; CAVALCANTE, W. L. G.; FERNANDEZ, R. M.; GALLACCI, M.; SOARES, A. M.; OLIVEIRA, C. L. P.; FONTES, M. R. M. Structural and Phylogenetic Studies with MjTX-I Reveal a Multi-Oligomeric Toxin - a Novel Feature in Lys49-PLA2s Protein Class. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 4, 2013.

SALVADOR, G. H. M.; DREYER, T. R.; CAVALCANTE, W. L. G.; MATIOLI, F. F.; DOS

SANTOS, J. I.; VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; GALLACCI, M.; FONTES, M. R. M. Structural and functional evidence for membrane docking and disruption sites on phospholipase A2-like proteins revealed by complexation with the inhibitor suramin. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [s. l.], v. 71, p. 2066–2078, 2015.

SALVADOR, G. H. M.; DOS SANTOS, J. I.; LOMONTE, B.; FONTES, M. R. M. Crystal structure of a phospholipase A2 from Bothrops asper venom: Insights into a new putative “myotoxic cluster”. **Biochimie**, [s. l.], v. 133, p. 95–102, 2017.

SALVADOR, G. H. M.; DREYER, T. R.; GOMES, A. A. S.; CAVALCANTE, W. L. G.; DOS SANTOS, J. I.; GANDIN, C. A.; DE OLIVEIRA NETO, M.; GALLACCI, M.; FONTES, M. R. M. Structural and functional characterization of suramin-bound MjTX-I from Bothrops moojeni suggests a particular myotoxic mechanism. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018.

SALVADOR, G. H. M.; CARDOSO, F. F.; GOMES, A. A.; CAVALCANTE, W. L. G.; GALLACCI, M.; FONTES, M. R. M. Search for efficient inhibitors of myotoxic activity induced by ophidian phospholipase A 2 -like proteins using functional, structural and bioinformatics approaches. **Scientific Reports**, [s. l.], 2019.

SANDRIN, M. D. F.; PUORTO, G.; NARDI, R. Serpentes e acidentes ofídicos: um estudo sobre erros conceituais em livros didáticos. **Investigações em Ensino de Ciências**, [s. l.], 2005.

SANZ, L.; DE FREITAS-LIMA, L. N.; QUESADA-BERNAT, S.; GRAÇA-DE-SOUZA, V. K.; SOARES, A. M.; CALDERÓN, L. de A.; CALVETE, J. J.; CALDEIRA, C. A. S. Comparative venomomics of Brazilian coral snakes: *Micrurus frontalis*, *Micrurus spixii* spixii, and *Micrurus surinamensis*. **Toxicon**, [s. l.], 2019.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1761, n. 11, p. 1246–1259, 2006.

SCHMIDT, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 65, n. 4, p. 363–372, 2004.

SETO, M.; OGAWA, T.; KODAMA, K.; MURAMOTO, K.; KANAYAMA, Y.; SAKAI, Y.; CHIJIWA, T.; OHNO, M. A novel recombinant system for functional expression of myonecrotic snake phospholipase A 2 in *Escherichia coli* using a new fusion affinity tag. **Protein Expression**

and Purification, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 194–202, 2008.

SILVA, A. M. Da; BERNARDE, P. S.; ABREU, L. C. De. ACCIDENTS WITH POISONOUS ANIMALS IN BRAZIL BY AGE AND SEX. **Journal of Human Growth and Development**, [s. l.], 2015.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: Classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1488, n. 1–2, p. 1–19, 2000.

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A2 homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 378, n. 2, p. 201–209, 2000.

SOARES, A. M.; SESTITO, W. P.; MARCUSSI, S.; STÁBELI, R. G.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; CUNHA, O. A. B.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R. Alkylation of myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops moojeni* venom: A promising approach to an enhanced antivenom production. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 258–270, 2004.

SOARES, A.; TICLI, F.; MARCUSSI, S.; LOURENCO, M.; JANUARIO, A.; SAMPAIO, S.; GIGLIO, J.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P. Medicinal Plants with Inhibitory Properties Against Snake Venoms. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 12, n. 22, p. 2625–2641, 2005.

SOUZA, A. M.; REIS, J. K. P.; ASSIS, R. A.; HORTA, C. C.; SIQUEIRA, F. F.; FACCHIN, S.; ALVARENGA, E. R.; CASTRO, C. S.; SALVARANI, F. M.; SILVA, R. O. S.; PIRES, P. S.; CONTIGLI, C.; LOBATO, F. C. F.; KALAPOTHAKIS, E. Molecular cloning and expression of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* type D and tests of animal immunization. **Genetics and Molecular Research**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 266–276, 2010.

TAN, N. H.; TAN, C. S. Acidimetric assay for phospholipase A using egg yolk suspension as substrate. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 170, n. 2, p. 282–288, 1988.

TICLI, F. K.; HAGE, L. I. S.; CAMBRAIA, R. S.; PEREIRA, P. S.; MAGRO, Â. J.; FONTES, M. R. M.; STÁBELI, R. G.; GIGLIO, J. R.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S.

V. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): Antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 318–327, 2005.

TOYAMA, M. H.; CARNEIRO, E. M.; MARANGONI, S.; AMARAL, M. E. C.; VELLOSO, L. A.; BOSCHERO, A. C. Isolation and characterization of a convulxin-like protein from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **Journal of Protein Chemistry**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 585–591, 2001.

TSAI, I. H.; WANG, Y. M. Effect of site directed mutagenesis on the activity of recombinant trimucrotoxin, a neurotoxic phospholipase from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **Toxicon**, [s. l.], v. 36, n. 11, p. 1591–1597, 1998.

TSUBOI, K.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A. Prostanoid receptor subtypes. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, [s. l.], v. 68–69, p. 535–556, 2002.

VONRHEIN, C. *et al.* Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 67, 293–302. 2011.

WARD, R. J.; DE OLIVEIRA, A. H. C.; BORTOLETO, R. K.; ROSA, J. C.; FAÇA, V. M.; GREENE, L. J. Refolding and purification of bothropstoxin-I, a Lys49-phospholipase A2 homologue, expressed as inclusion bodies in *escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 134–140, 2001.

WARD, R. J.; DE OLIVEIRA, A. H. C.; BORTOLETO, R. K.; ROSA, J. C.; FAÇA, V. M.; GREENE, L. J. Refolding and purification of bothropstoxin-I, a Lys49 phospholipase A2 homologue, expressed as inclusion bodies in *escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 134–140, 2001.

WARRELL, D.A. The global problem of snake bite: Its prevention and treatment. Em: Gopalakrishnakone P, Tan CK (Editores) **Recent advances in toxinology research, Venom and Toxin Research Group, National University of Singapore**, Cingapura, 121-53. 1992.

WARRELL, D.A. Snake bite. **Lancet** 375: 77-88. 2010.

WARRELL, D. A. Venomous Bites, Stings, and Poisoning. **Infectious Disease Clinics of North America**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 207–223, 2012.

WU, Y. Synergistic Microbicidal Effect of Auranofin and Antibiotics Against Planktonic and Biofilm-Encased. [s. l.], v. 10, n. October, p. 1–12, 2019.

YANG, W. L.; PENG, L. S.; ZHONG, X. F.; WEI, J. W.; JIANG, X. Y.; YE, L. T.; ZOU, L.; TU, H. Bin; WU, W. Y.; XU, A. L. Functional expression and characterization of a recombinant phospholipase A2 from sea snake *Lapemis hardwickii* as a soluble protein in *E. coli*. **Toxicon**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 713–721, 2003.

YESILIRMAK, F.; SAYERS, Z. Heterologous expression of plant genes. **International Journal of Plant Genomics**, [s. l.], v. 2009, 2009.

YIN, J.; LI, G.; REN, X.; HERRLER, G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 127, n. 3, p. 335–347, 2007.

YANG, W. L.; PENG, L. S.; ZHONG, X. F.; WEI, J. W.; JIANG, X. Y.; YE, L. T.; ZOU, L.; TU, H. Bin; WU, W. Y.; XU, A. L. Functional expression and characterization of a recombinant phospholipase A2 from sea snake *Lapemis hardwickii* as a soluble protein in *E. coli*. **Toxicon**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 713–721, 2003.

YESILIRMAK, F.; SAYERS, Z. Heterologous expression of plant genes. **International Journal of Plant Genomics**, [s. l.], v. 2009, 2009.

YIN, J.; LI, G.; REN, X.; HERRLER, G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 127, n. 3, p. 335–347, 2007.

ZHOU, X.; TAN, T. C.; VALIYAVEETIL, S.; MEI, L. G.; KINI, R. M.; VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; SIVARAMAN, J. Structural characterization of myotoxic ecarpholin S from *Echis carinatus* venom. **Biophysical Journal**, [s. l.], v. 95, n. 7, p. 3366–3380, 2008.