

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/02/2021.

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 *A₂-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 ZeocinaTM 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 ZeocinaTM.
- Figura 21:** Tubos contendo bactérias em diferentes concentrações de ZeocinaTM

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]	Elipcticidade 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	Coeficiente 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	Polietilenoglicol;
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 TM ;
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-oxyde 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).

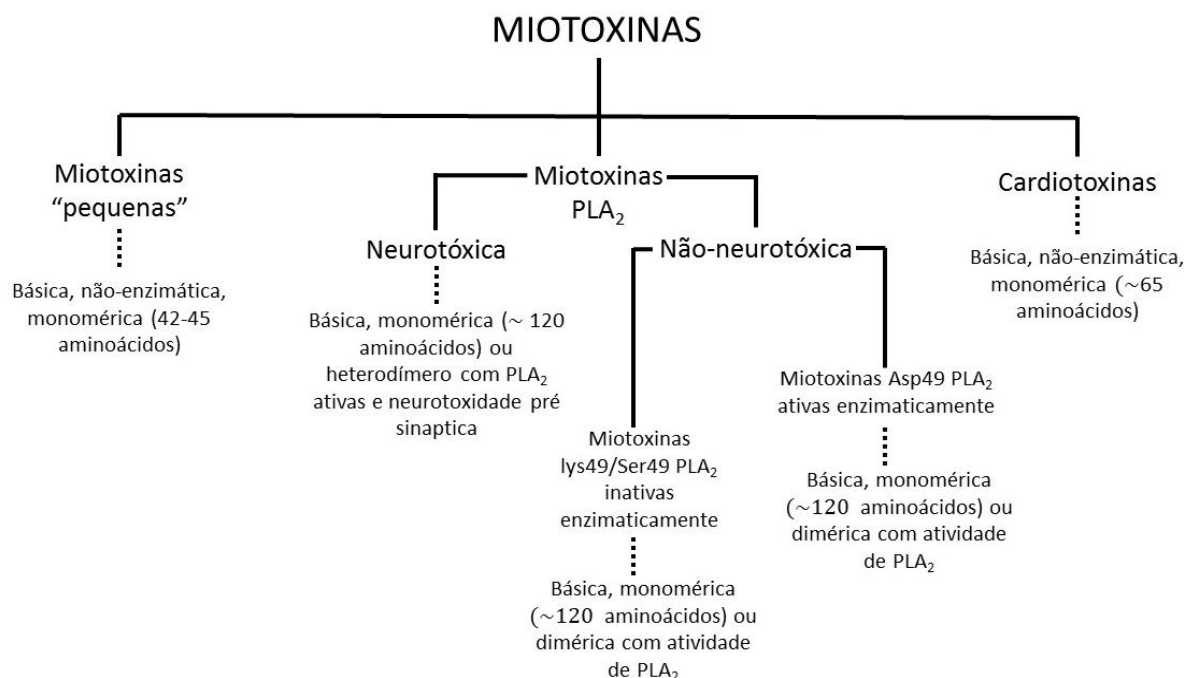


Figura 2. Classificação e características gerais das miotoxinas dos venenos de serpentes. Lys49, Ser49 e Asp49 referem-se aos resíduos de aminoácidos de lisina, serina e ácido aspártico na posição 49 (RENETSEDER *et al.*, 1985) de sua respectiva fosfolipase A₂ (PLA₂) miotóxica. Adaptação de LOMONTE *et 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 glicerofosfolídeos, liberando lisofosfolídeos 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 lisofosfolídeos liberados estão relacionados a processos de sinalização da célula e em alterações no citoesqueleto, promovendo a remodelagem dos fosfolídeos 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).

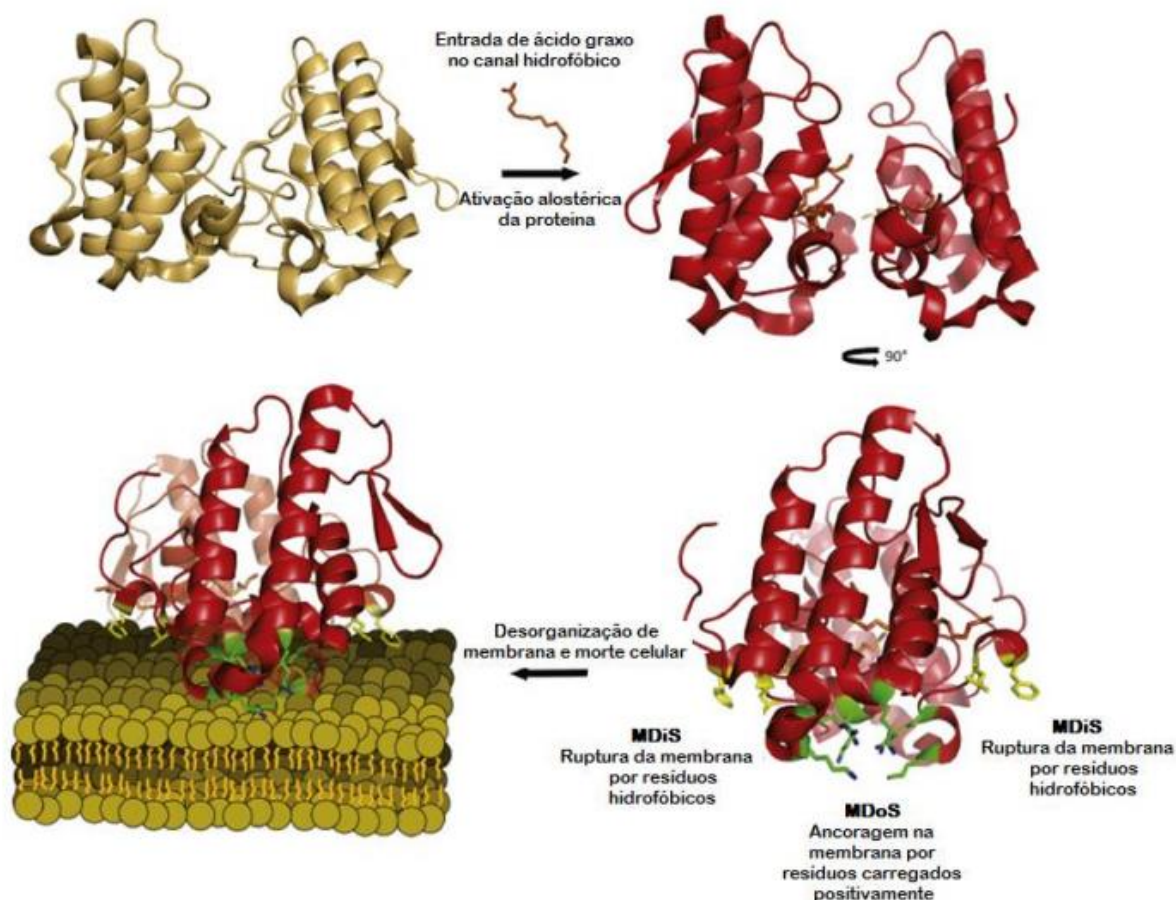


Figura 3. Mecanismo miotóxico proposto das proteínas PLA₂-like. A entrada do ácido graxo no canal hidrofóbico da proteína leva a uma ativação “alostérica” da proteína pela reorientação do dímero. Na forma ativa, o MDoS e MDiS ficam alinhados no mesmo plano, expostos ao solvente. A região MDoS estabiliza 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).

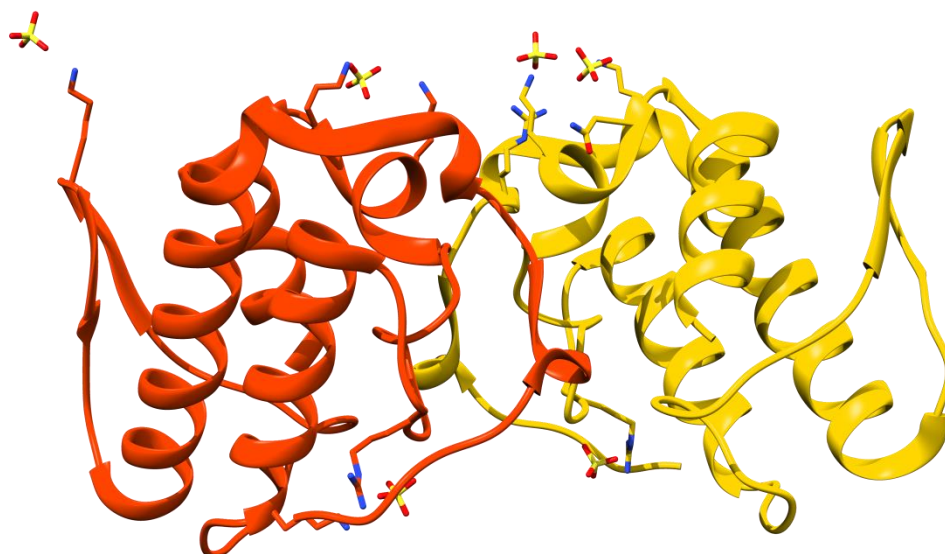


Figura 4. Representação da estrutura dimérica da BnSP-7 nativa. A toxina representada em *cartoon* apresenta sua composição homodimérica (monômero A e B, respectivamente em vermelho e amarelo) e os resíduos desta toxina em interação a íons SO_4^{2-} , ambos representados em *sticks*. Adaptado de LIMA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

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**,

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-ARAUJO, 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 *Zhafermia 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.