



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA (PPGGB – UFU)

Caracterização bioquímica e funcional da rBnSP-7: Uma fosfolipase A₂ homóloga recombinante de *Bothrops pauloensis*

Lino Fernando Gomes de Lima

Orientadora: Prof^a Dra Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Co-orientadora: Prof^a Dra Renata Santos Rodrigues

UBERLÂNDIA-MG

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA (PPGGB – UFU)

Caracterização bioquímica e funcional da rBnSP-7: Uma fosfolipase A₂ homóloga recombinante de *Bothrops pauloensis*

Lino Fernando Gomes de Lima

Orientadora: Prof^a Dra Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Co-orientadora: Prof^a Dra Renata Santos Rodrigues

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica)

UBERLÂNDIA-MG

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- L732c Lima, Lino Fernando Gomes de, 1988-
2013 Caracterização bioquímica e funcional da rBnSP-7: uma
fosfolipase A₂ homóloga recombinante de *Bothrops pauloensis*/ Lino
Fernando Gomes de Lima. -- 2013.
95 f. : il.
- Orientadora : Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.
Coorientadora: Renata Santos Rodrigues.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
Inclui bibliografia.
1. Genética - Teses. 2. Bioquímica - Teses. 3. Esterases - Teses.
I. Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues. II. Rodrigues, Renata Santos.
III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação
em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA (PPGGB – UFU)

Caracterização bioquímica e funcional da rBnSP-7: Uma fosfolipase A₂ homóloga recombinante de *Bothrops pauloensis*

Lino Fernando Gomes de Lima

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: _____
Profª Dra Veridiana de Melo Rodrigues Avila

Examinadores: Dra Juliana Izabel dos Santos
Dra Ludier Kesser Santos Silva

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Profª Dra Veridiana de Melo Rodrigues Avila

Dedicatória

Primeiramente a Deus, que é a razão e o motivo de todas as coisas, caminho de paz, guia e porto seguro. Sei que estou seguro em suas mãos *“Porque eu bem sei os pensamentos que tenho a vosso respeito, diz o SENHOR; pensamentos de paz, e não de mal, para vos dar o fim que esperais.”* (Jr 29:11).

...

Aos meus pais, Marcio e Madalena, detentores de um amor puro e incondicional. Saibam que nenhuma das minhas conquistas pessoais e profissionais seria possível de ser concretizada sem os conceitos de ética, perseverança, integridade, bondade e virtude que vocês me propiciaram. A vocês que me ensinaram também a buscar sempre em Deus à força maior para o meu desenvolvimento como ser humano eu dedico não só esse trabalho, mas a minha eterna gratidão e amor.

...

Um agradecimento mais que especial a minha amada Jayça Marim, essa pessoinha que teve papel e importância fundamental nessa etapa da minha vida. Mesmo que nossos destinos tenham se cruzado na metade desse caminho você tornou possível a conclusão dessa etapa tendo suportado os meus momentos mais complicados com paciência, dedicação e amor, compreendendo-me e ensinando-me para que eu conquistasse um lugar ao sol. Você consegue transformar meus dias cinzas em dias multicoloridos, como um raio de sol incidindo em um cristal. Amo você hoje e sempre, você é a razão...

...

A todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para esta imensa felicidade que sinto ao conseguir alcançar mais um degrau nessa escada que é a vida. A todos vocês é dedicado esse trabalho.

Agradecimentos

Primeiramente não poderia deixar de agradecer à profª Dra Veridiana de Melo Rodrigues Ávila pela orientação durante esses anos com dedicação, devoção e paciência com seus alunos nem sempre tão disciplinados (só relembrar, como exemplo, da odisséia do meu caderno né hehehe). Detentora de características tão únicas e sublimes que por si já te fazem uma pessoa especial. Mas além disso tudo, você Veri, é uma verdadeira mãe dos seus alunos, que se entrega de corpo e alma pelos nossos projetos, sofre com o nosso sofrimento, chora e sorri com as conquistas dos seus “filhos” laboratoriais. Amiga, carinhosa, honesta e humilde. Exemplo e modelo admirável de profissional e pessoa. Obrigado por tudo!

•••

À profª Dra Renata Santos Rodrigues. Sua ajuda, cooperação e comprometimento com esse trabalho foram fundamentais para que este fosse realizado. Obrigado pelo apoio, pelos conhecimentos sobre biologia molecular e pelas horas de esforço “quebrando a cabeça” junto comigo nos contratempos “enzimáticos” no decorrer desse trabalho.

•••

À profª Dra Maria Inês. Suas contribuições na minha formação inicial possibilitaram que esse momento fosse possível.

•••

A minha amiga “Dayaniiii” (Dayane), parceira de todas as horas, é como eu sempre digo Day, se eu sou sua “amiga” você é meu “brodi” hehehe. Obrigado pelos auxílios nos experimentos e pelo incentivo nos momentos mais conturbados. Espero que nossa amizade perdure por muitos anos.

•••

Ao meu grande amigo David, “Há amigos mais chegados que um irmão” (Pv 18.24). Companheiro de profissão e de vida. Obrigado pelo apoio e pelos conselhos.

•••

A Márcia e Fernanda pelos momentos em que aprendi sobre maquiagem, esmaltes e sandálias (brincadeira!! Hehehe). Obrigado pelos conselhos e pela força nas nossas inúmeras conversas.

•••

A Daiana pelas valiosas contribuições intelectuais e experimentais e ao Lamartine pelos anticorpos.

•••

Aos meus colegas do laboratório: Débora, Guilherme, Isabela, Letícia, Makswell, Sarah e Thais por direta ou indiretamente colaborarem para a realização desse trabalho.

•••

Ao Prof. Dr. Marcos Fontes e seu grupo pelo apoio na caracterização estrutural, em especial ao Msc Carlos Alexandre pela paciência e disponibilidade durante esse processo.

•••

A profª Dra Bonetti e o pessoal do seu laboratório, assim como a profª Dra Terezinha e a dona Maria Helena do Laboratório de reprodução animal pelo apoio, paciência e espaço físico enquanto vivíamos a “diáspora laboratorial” decorrentes da reforma.

•••

Aos funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica: Tianinha, Marina, Gérson e Madson.

•••

Ao apoio financeiro da FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais) e da UFU (Universidade Federal de Uberlândia).

***“O futuro pertence àqueles que acreditam na
beleza de seus sonhos.”***

- Eleanor Roosevelt

Sumário

Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas	xiv
APRESENTAÇÃO	1
CAPÍTULO 1.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1 . Fosfolipases A₂ (PLA₂)	3
1.2. PLA₂s secretadas (sPLA₂)	5
1.3. PLA₂ de peçonhas de serpentes: BnSP – 7.....	9
1.4. Expressão de proteínas heterólogas	13
1.4.1. Comparação entre sistemas de expressão em <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i>	13
1.4.2. Sistema de expressão em <i>P. pastoris</i>	14
1.4.3 Metabolismo do metanol	16
1.4.4. Vetores de expressão	17
1.4.5. Integração ao genoma de <i>P. pastoris</i>	18
1.4.6. Via de enovelamento.....	19
1.5. Clonagem e expressão de toxinas de peçonhas de serpentes	19
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
CAPÍTULO 2.....	33
RESUMO.....	35
ABSTRACT	36
1. INTRODUÇÃO.....	37

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1. Obtenção da peçonha, PLA ₂ BnSP-7 nativa e anticorpos anti-BnSP-7	40
2.2 Animais	40
2.3. Obtenção do gene da fosfolipase A2 BnSP-7 da biblioteca de cDNA de B.	41
2.4. Sequenciamento e análise de nucleotídeos da BnSP-7	41
2.5. Clonagem e expressão da rBnSP-7	41
2.5.1. Construção do vetor para expressão da rBnSP-7 em <i>Pichia pastoris</i>	41
2.5.2. Preparo de bactérias (DH5 α) competentes para choque térmico com..	43
2.5.3. Transformação de células de <i>Escherichia coli</i> (DH5 α).....	43
2.5.4. PCR de colônia dos transformantes de <i>E. coli</i> DH5 α	43
2.5.5. Preparação do DNA plasmidial por lise alcalina (<i>Miniprep</i>)	44
2.5.6. Linearização do plasmídeo pPicZ α A-BnSP7 com enzima de restrição PmeI	45
2.5.7. Preparo das células competentes de <i>P. pastoris</i>	45
2.5.8. Transformação das células competentes de <i>P. pastoris</i> por.....	46
2.5.9. PCR de colônia dos transformantes de <i>P. pastoris</i>	46
2.5.10. Triagem em placa da expressão heteróloga em <i>P. pastoris</i>	47
2.5.11. Indução em larga escala	47
2.6. Isolamento da fosfolipase rBnSP-7	48
2.6.1. Purificação de proteínas produzidas em <i>P. pastoris</i>	48
2.7. Caracterização bioquímica	49
2.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS- PAGE)	49
2.7.2. Western blotting.....	49
2.7.3. Dosagem de Proteínas	50
2.8. Caracterização Bioquímica e Estrutural	50
2.8.1. Focalização Isoelétrica	50

2.9. Caracterização funcional.....	51
2.9.1. Estudo do efeito miotóxico em músculo gastrocnêmio de camundongos	51
2.9.2. Análise da citotoxicidade sobre cultura de células tEnd e Hela.....	52
2.9.3. Análise da citotoxicidade sobre cultura de células C2C12	53
2.10. Dicroísmo circular (CD)	53
2.11. Análise Estatística	54
3. RESULTADOS.....	55
3.1. Caracterização do perfil de expressão de PLA2 da biblioteca de cDNA da.....	55
3.2. Construção do vetor de expressão pPicZαA-BnSP7	55
3.3. Clonagem do vetor pPicZαA-BnSP7 em <i>E. coli</i> DH5α competentes.....	57
3.4. Linearização do vetor pPicZαA	59
3.5. Transformação em <i>P. pastoris</i> KM71H.....	59
3.6. Expressão das proteínas recombinantes.....	60
3.7. Purificação da rBnSP – 7	60
3.8. Caracterização bioquímica.....	61
3.9. Caracterização funcional.....	62
3.9.1. Atividade miotóxica analisada por dosagem de creatina cinase no.....	62
3.9.2. Análise de citotoxicidade em cultura celular.....	63
3.10. Caracterização estrutural: Dicroísmo circular (CD).....	66
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	68
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

Lista de figuras

CAPÍTULO 1

Figura 1. Reação genérica de catálise por PLA ₂	03
Figura 2. Mecanismo catalítico das fosfolipases	05
Figura 3. Enovelamento de PLA ₂ s do grupo IA em estrutura secundária	07
Figura 4. Enovelamento de PLA ₂ s do grupo IIA em estrutura secundária	08
Figura 5. Cadeia principal da Miotoxina II de <i>Bothrops asper</i> sobreposta a cadeia principal de Bothropstoxina I de <i>Bothrops jararacussu</i>	11
Figura 6. Estrutura secundária da BnSP-7	13
Figura 7. Via do metanol em <i>P. pastoris</i>	16
Figura 8. Diagrama de um vetor pPICZα	18

CAPÍTULO 2

Figura 1. Representação esquemática da construção do plasmídeo de expressão pPicZαA-BnSP7	42
Figura 2. Sequência de aminoácidos da fosfolipase recombinante e alinhamento com a sequência da proteína nativa	57
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR de colônia	57
Figura 4. Sequência de nucleotídeos do plasmídeo recombinante pPicZαA-BnSP7	58
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% da linearização com PmeI e de colônia dos transformantes de pPICZα	59
Figura 6. Gel de poliácridamida a 12,5% corado com nitrato de prata mostrando a expressão da proteína rBnSP-7	60
Figura 7. Gel de poliácridamida a 12,5% corado com nitrato de prata mostrando a purificação da proteína rBnSP-7	61
Figura 8. Gel de poliácridamida a 12,5% da rBnSP-7 purificado corado com coomassie blue, western blotting da proteína rBnSP-7 e Ensaio de focalização isoeletrica da rBnSP-7	62
Figura 9. Atividade miotóxica por dosagem de creatina cinase	63

Figura 10. Porcentagem de viabilidade celular segundo o método de MTT em células tEnd	64
Figura 11. Porcentagem de viabilidade celular segundo o método de MTT em células HeLa	65
Figura 12. Avaliação da citotoxicidade direta em células C2C12	66
Figura 13. Espectro de dicroísmo circular da BnSP-7 recombinante submetida ao processo de liofilização e espectro de dicroísmo circular da BnSP-7 nativa (BnSP7-w) e BnSP-7recombinante não liofilizada.....	67

Lista de tabelas

CAPÍTULO 2

Tabela I. *Clusters* identificados no Transcriptoma da glândula de veneno de *B.*

pauloensis 56

Lista de abreviaturas

.opj	Arquivo de extensão Origin Graph
μF	Microfarads
μg	Micrograma
μL	Microlitro
Å	Ångström
ADP	Adenosina difosfato
AgNO₃	Nitrato de prata
ANOVA	Análise de variância (Analysis of variance)
AOX1	Álcool oxidase 1
AOX2	Álcool oxidase 2
ATP	Adenosina trifosfato
BaltTX-I	Fosfolipase A ₂ Lys49 básica isolada da peçonha de <i>Bothrops alternatus</i>
BMGY	Meio Complexo de glicerol (Buffered Glycerol-complex Medium)
BMMY	Meio Complexo de metanol (Buffered Methanol-complex Medium)
BmoopLA₂	Fosfolipase A ₂ ácida isolada da peçonha de <i>Bothrops moojeni</i>
BnpTX-I	Fosfolipase A ₂ ácida Asp49 isolada da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>
BnpTX-II	Fosfolipase A ₂ ácida Asp49 isolada da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>
BnSP-7	Fosfolipase A ₂ Lys49 básica isolada da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>
Bp-PLA₂	Fosfolipase A ₂ ácida isolada da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>
BpPLA₂-TXI	Fosfolipase A ₂ ácida isolada da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>
BthTx-I	Bothropstoxina-I, fosfolipase A ₂ Lys49 básica isolada da peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i>
C2C12	Linhagem celular de mioblasto murino
Ca²⁺	Íon cálcio
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
CD	Dicroísmo circular (Circular Dichroism)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar (Complementary deoxyribonucleic acid)
CHAPS	3-[Dimethyl[3-(4-{5,9,16-trihydroxy-2,15 dimethyltetracyclo [8.7.0.0 ^{2,7} .0 ^{11,15}] heptadecan-14-yl}pentanamido)propyl] azaniumyl}propane-1-sulfonate
CK	Creatina cinase (Creatine kinase)
cm	Centímetro
c-myc	Epítipo responsável pelo reconhecimento por anticorpos específicos
CO₂	Dióxido de carbono
COO⁻	Carboxilato
cPLA₂	Fosfolipase A ₂ citosólicas (Cytosolic phospholipases A ₂)
Cu⁺¹	Íon cuproso
Cu⁺²	Íon cúprico
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DAK	Dihidroxiacetona cinase (Dihydroxyacetone kinase)
DAS	Dihidroxiacetona sintase (Dihydroxyacetone synthase)
DHA	Dihidroxiacetona (Dihydroxyacetone)

DHAP	Dihidroxiacetona fosfato (Dihydroxyacetone phosphate)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
dNTP's	Desoxinucleotídeos trifosfato (Deoxynucleotide triphosphates)
DO	Densidade óptica
DO_{600nm}	Densidade óptica a 600 nanômetros
dpi	Pontos por polegada (Dots per inch)
DTT	Ditiotreitol
E	Enzima
EcoRI	Enzima de restrição isolada a partir de cepas de <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético (Ethylenediamine tetraacetic acid)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
F1,6BP	Frutose-1,6-bisfosfato (Fructose-1,6-biphosphate)
F6P	Frutose-6-fosfato (Fructose-6-phosphate)
FBA	Frutose-1,6-bifosfato aldolase
FBP	Frutose-1,6-bifosfatase (Fructose-1,6-bisphosphatase)
FDH	Formiato desidrogenase
FGH	S-formil glutationa hidrolase
FLD	Formaldeído desidrogenase
g	Grama
G-6-P	Glicose-6-fosfato (Glycose-6-phosphate)
GAP	Gliceraldeído-3-fosfato (Glyceraldehyde-3-phosphate)
GSH	Glutationa
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
Hela	Linhagem celular de carcinoma do colo de útero
HEPES	Ácido 4 - (2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
His-Tag	Cauda de poli-histidina
IgG	Imunoglobulina G
IPG	Gel de pH imobilizado (Immobilized pH gel)
iPLA₂	Fosfolipase A ₂ independente de cálcio (Phosfolipases A ₂ Calcium Independent)
kDa	kilodalton
LB	Meio Luria-Bertani
LDH	Lactato desidrogenase
M	Molar
mA	miliampere
MCS	Sítios de clonagem múltipla (Multiple cloning site)
mg	miligrama
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	mililitro
mM	Milimolar
MRE	Elípticidade molar média por resíduo (Mean Residue Ellipticity/ degrees cm ² dmol ⁻¹ residue ⁻¹)
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro (Messenger ribonucleic acid)
MTT	3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo difenil tetrazólio (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)
Mut⁺	Fenótipo da utilização de metanol pela álcool oxidase 1

Mut^s	Fenótipo da utilização de metanol pela álcool oxidase 2
n	Amostragem
N₂	Nitrogênio gasoso
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	Dicotinamida adenina dinucleotídeo
NAD⁺	Dicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	Dicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NaH₂PO₄	Fosfato de sódio monossódico
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
O₂	Oxigênio gasoso
OPD	o-Fenilenediamina dihidrocloridato
ORF	Fase aberta de leitura (Open reading frame)
P	Produto catalítico
PAF-AH	Fator ativador de plaquetas acetil hidrolase (Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase)
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salina (Phosphate-buffered saline)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
Pi	Fosfato (Phosphate)
PLA₂	Fosfolipases A ₂ (Fosfolipases A ₂ (E.C. 3.1.1.4))
Pmel	Enzima de restrição isolada a partir de cepas de <i>Pseudomonas mendocina</i>
PM	Picomolar
PSA	Persulfato de amônio
RNAse	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
S	Substrato catalítico
Sall	Enzima de restrição isolada a partir de cepas de <i>Streptomyces albue</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio (Sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
sPLA₂	Fosfolipase A ₂ secretadas (Secreted phospholipases A ₂)
TBS	Tampão tris-salina (Tris buffered saline)
TEMED	Tetrametiletilenodiamina (Tetramethylethylenediamine)
tEnd	Endotélio de timo (Thymic endothelium)
TI	Intermediário tetraédrico
TPI	Trifosfato isomerase (Triosephosphate isomerase)
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreto
U/L	Unidades/litro
V	Volts
xg	Força centrífuga aplicada “x” vezes maior que a força gravitacional da Terra
Xu5P	Xilulose-5-fosfato (Xylulose-5-phosphate)

YPD	Meio contendo extrato de levedura, peptona e dextrose (Yeast Extract Peptone Dextrose)
YPDS	Meio contendo extrato de levedura, peptona, dextrose e sorbitol (Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol)
Θ	Elípticidade molar
Ω	Ohm

Apresentação

Fosfolipases A₂ (PLA₂) são componentes presentes em peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* responsáveis pelo rompimento da integridade de membranas celulares, através da hidrólise de fosfolipídios na posição sn-2 do glicerol, culminando na morte celular. As PLA₂s estão distribuídas em 15 grupos (I a XV) os quais estão presentes em cinco categorias, sendo que se destaca as PLA₂s secretadas (sPLA₂), grupo que inclui as PLA₂s encontradas em peçonhas de serpentes. BnSP-7 é uma Lys49-PLA₂ cataliticamente inativa de 14.000 Da, isolada de *Bothrops pauloensis*. Essa proteína apresenta potencial terapêutico como bactericida, anti-leishmania e efeitos antitumorais, além de induzir morte bacteriana em *Escherichia coli*. A produção de proteínas heterólogas pode ser obtida em diferentes hospedeiros como, bactérias, leveduras e células de mamíferos, sendo que, nas últimas três décadas, a bactéria *E. coli* tem sido usada extensivamente nesse processo. Contudo, uma grande variedade de proteínas que não podem ser expressas em *E. coli* no nível correto de maturação pós-traducional foram subsequentemente produzidas em levedura metilotrófica, *Pichia pastoris*. Esse sistema de expressão é utilizado satisfatoriamente há mais de 20 anos para a produção e secreção de proteínas recombinantes.

No presente trabalho foi realizada a clonagem, expressão, purificação e caracterização estrutural e funcional da rBnSP-7, por esta ser uma molécula alvo com potencialidade terapêutica interessante, devido as ações locais e sistêmicas que ela apresenta.

A apresentação deste trabalho foi realizada seguindo as normas do curso de Pós Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia-MG e da Associação Brasileira de Normas Técnicas, a ABNT, sendo dividida em dois capítulos. O CAPÍTULO 1 – Introdução geral ou fundamentação teórica elucidando características das fosfolipases A₂ (PLA₂), com ênfase nas PLA₂s secretadas (sPLA₂), presentes nas peçonhas de serpentes, bem como os processos de obtenção de proteínas heterólogas, destacando o sistema em *Pichia pastoris* e suas características. O CAPÍTULO 2 – apresenta o artigo intitulado: Caracterização bioquímica e funcional da rBnSP-7: Uma fosfolipase A₂ homóloga recombinante de *Bothrops pauloensis* (artigo em preparação).

Capítulo 1:

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Introdução

1.1 . Fosfolipases A₂ (PLA₂)

As fosfolipases A₂ (PLA₂, E.C. 3.1.1.4) são encontradas em diversos organismos tais como mamíferos, peçonhas de artrópodes e serpentes (HIGUCHI *et al.*, 2007; ZOUARI-KESSENTINI *et al.*, 2009; GARCIA-DENEGRI *et al.*, 2010). Estas desempenham papéis importantes no metabolismo de lipídios, tendo como principais substratos os fosfolipídeos de membrana plasmática e, além disso, hidrolisam especialmente a ligação acil-éster na posição *sn*-2 dos glicerofosfolipídeos (ARNI & WARD, 1996; KINI., 2003), liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos, principalmente, o ácido araquidônico. (**Figura 1**)

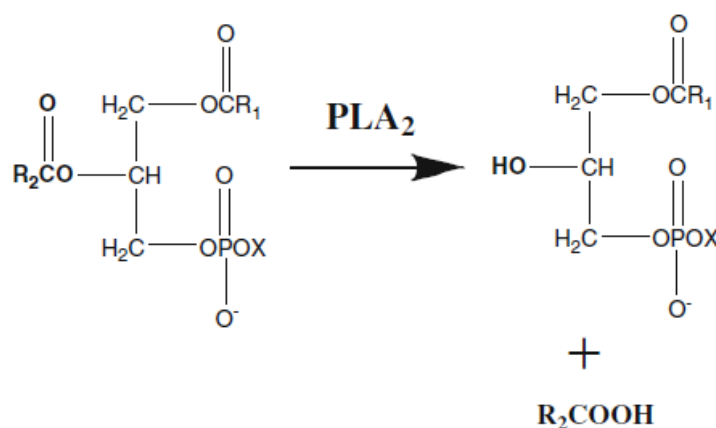


Figura 1. Reação de catálise por PLA₂. : O fosfolipídio, representado à esquerda é hidrolisado na posição *sn*-2, liberando um lisofosfolipídio e um ácido graxo, representados à direita. (BURKE e DENNIS, 2009a)

Os produtos derivados da ação de PLA₂s sobre fosfolipídeos de membrana representam precursores de moléculas de sinalização que podem exercer uma grande variedade de funções biológicas. Os lisofosfolipídeos estão associados no processo de sinalização celular e na remodelagem dos fosfolipídeos da membrana. Além disso, os lisofosfolipídeos podem atuar como precursor de mediadores lipídicos, tais como ácido lisofosfatídico – envolvido na sobrevivência, proliferação e migração celular – e o fator de ativação plaquetária, particularmente relacionado aos processos inflamatórios. Já ácido araquidônico, liberado na ação enzimática das fosfolipases, também

desempenha papel de precursor de lipídeos bioativos (eicosanóides) como as prostaglandinas, tromboxanas, prostaciclina e leucotrienos. Os eicosanóides detêm funções sobre uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, atuando na regulação do sono, na formação de potentes mediadores das respostas imunes e da inflamação, e na percepção da dor (SIX e DENNIS, 2000; SCHALOSKE e DENNIS, 2006).

O modelo do mecanismo catalítico das fosfolipases A₂ foi proposto inicialmente por Scott *et al.* (1990) e alguns anos depois revisado por Kini (2003). Segundo esse modelo, a ação catalítica dessas enzimas ocorre durante o mecanismo de ativação interfacial, em quatro estágios principais (**Figura 2**). Primariamente, o sítio catalítico da enzima na forma ativada possui um íon cálcio que é coordenado pela carboxila da cadeia lateral do Asp49, por duas moléculas de água estrutural, além dos oxigênios do carboxilato (COO⁻) nos resíduos 28 e 30 do loop de ligação ao cálcio. O nitrogênio gama (γ) da cadeia lateral da histidina auxilia na coordenação de uma das moléculas de água, formando assim, o complexo enzima ativada – substrato, a partir do deslocamento, pelo fosfolípido, de uma das moléculas de água coordenadas pelo íon cálcio presente no sítio ativo (**estágio 1**). Através de interações eletrostáticas, o íon cálcio polariza a carbonila localizada na posição sn-2 do substrato, aumentando o caráter eletrofílico desse carbono. Posteriormente, ocorre o ataque nucleofílico de uma molécula de água sobre a carbonila sn-2. O ataque à carbonila leva à formação do complexo enzima ativada – intermediário tetraédrico (**estágio 2**). Por cisão heterolítica, o caráter de dupla ligação da carbonila sn-2 (**estágio 3**) é restituída, formando assim o complexo enzima ativada – produto. Por último, ocorre a protonação do lisofosfolípido formado (**estágio 4**), juntamente com a desprotonação do nitrogênio γ da histidina. Nesse estágio, o sítio catalítico é regenerado às condições iniciais e ocorre a formação de produtos não ionizados, liberados na seqüência de reações.

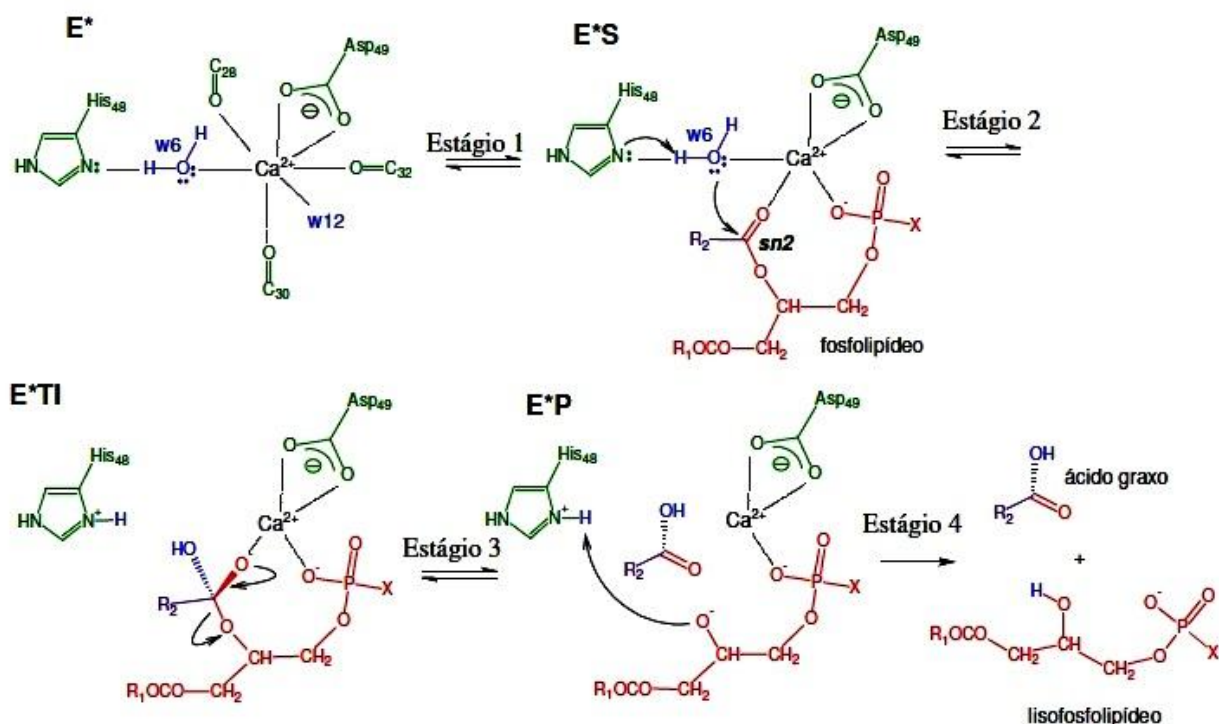


Figura 2: Mecanismo catalítico das fosfolipases A₂. Os componentes enzimáticos estão indicados em verde; o substrato em vermelho; moléculas de água (w6, w12) em azul. Enzima ativada (E*), complexo enzima ativa-substrato (E*-S), complexo enzima ativa- substrato tetraédrico (E*-TI), complexo enzima ativa-produto (E*-P). (Fonte – OLIVEIRA, 2006)

As PLA₂s estão distribuídas em 15 grupos (I a XV) os quais estão presentes em cinco categorias de acordo com a origem, sequência de aminoácidos, mecanismos catalíticos, características funcionais e estruturais. Estes grupos incluem as PLA₂s citosólicas (cPLA₂), as PLA₂s Ca²⁺ independentes (iPLA₂), as acetil-hidrolases - fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH), a PLA₂ lisossomal e as PLA₂s secretadas (sPLA₂), grupo que inclui as PLA₂s encontradas em peçonhas de serpentes (SCHALOSKE e DENNIS, 2006; BURKE e DENNIS, 2009a).

1.2. PLA₂s secretadas (sPLA₂)

As sPLA₂ estão envolvidas em várias desordens inflamatórias em humanos, tais como asma brônquica (BOWTON *et al.*, 1997), rinite alérgica (STADEL *et al.*, 1994), choque séptico (VADAS, 1984), pancreatite aguda (SCHRODER *et al.*, 1980), doenças auto-imunes (VADAS e PRUZANSKI, 1986) e no envenenamento por animais

peçonhentos (NISHIOKA e SILVEIRA, 1992; SOARES *et al.*, 2004; SANTOS-FILHO *et al.*, 2008).

As sPLA₂s são enzimas com massa molecular variável entre 14.000 e 18.000 Daltons, além de usualmente possuírem de 5 a 8 pontes dissulfeto. Estas enzimas apresentam uma histidina no sítio ativo e requerem a presença do íon Ca²⁺ que, na ordem de milimolar, é um co-fator essencial para a ligação do substrato no sítio catalítico e para o processo enzimático dessas proteínas. (BERG *et al.*, 2001; SIX e DENNIS, 2000; SCHALOSKE e DENNIS, 2006; BURKE e DENNIS, 2009a).

As fosfolipases A₂ dos grupos IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII, XIV são representantes das sPLA₂s (BURKE e DENNIS, 2009b; KANG *et al.*, 2011). As PLA₂s de peçonhas de serpentes (svPLA₂s) estão classificadas nos grupos IA e IIA. O grupo IA compreende peçonhas de serpentes das famílias Hydrophidae e Elapidae, enquanto o grupo IIA inclui peçonhas de serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae (FRY *et al.*, 2008).

As enzimas pertencentes aos grupos I e II possuem sequência de aminoácidos e pontes dissulfeto altamente conservados, sendo seis delas em posições fixas, unindo os resíduos 27-131, 29-45, 44-109, 51-102, 61-95 e 85-100, e uma sétima, cuja posição é variável (WANG *et al.*, 1996). Além de uma alta similaridade nas sequências de aminoácidos desses dois grupos, existe um alto grau de homologia em sua estrutura terciária, o que inclui três α -hélices (resíduos 1-12, 37-54 e 90-109) e uma alça de ligação com o cálcio na região dos resíduos 24-30 (SCOTT, 1997). Análises estruturais dessas enzimas revelaram em sua composição cerca de 50% de α -hélices (DENNIS, 1994) e uma quantidade relativamente pequena de folhas β , normalmente formada por um única região (resíduos 74-84, localizados entre as hélices 2 e 3), a qual é estabilizada pelo nitrogênio N-terminal (SCOTT, 1997).

Adicionalmente, as fosfolipases A₂ do grupo IA possuem como característica típica, a presença de uma alça localizada na superfície chamada “alça elapídica”, a qual conecta a uma α -hélice (H2) e a uma folha β (SIX & DENNIS, 2000). Essas enzimas apresentam as três regiões em α -hélices peculiares a esse grupo (**Figura 3**), sendo uma delas a hélice H1 (resíduos 2-12), na porção N-terminal e duas hélices antiparalelas, H2 (resíduos 40-55) e H3 (resíduos 86-103). Ainda existem em sua estrutura outras duas hélices curtas, que envolvem os resíduos 19-22 (SH4) e 108-110 (SH5). Os resíduos 70-

74 e 76-79 constituem as folhas β da estrutura dessas proteínas (FREMONT *et al.*, 1993; JABEEN *et al.*, 2005; 2006; SINGH *et al.*, 2001; 2005; KANG *et al.*, 2011).

O sítio ativo é formado pelos resíduos His48, Asp49, Tyr52 e Asp94. Há um loop de ligação ao cálcio, que estabiliza essa molécula na estrutura a partir de uma estrutura pentagonal formada por dois átomos de oxigênio do carboxilato (COO^-) associada ao resíduo Asp49 da região catalítica, além de três átomos de oxigênio ligado aos resíduos Tyr28, Gly30 e Gly32, e duas moléculas de água estruturalmente conservadas. (KANG *et al.*, 2011)

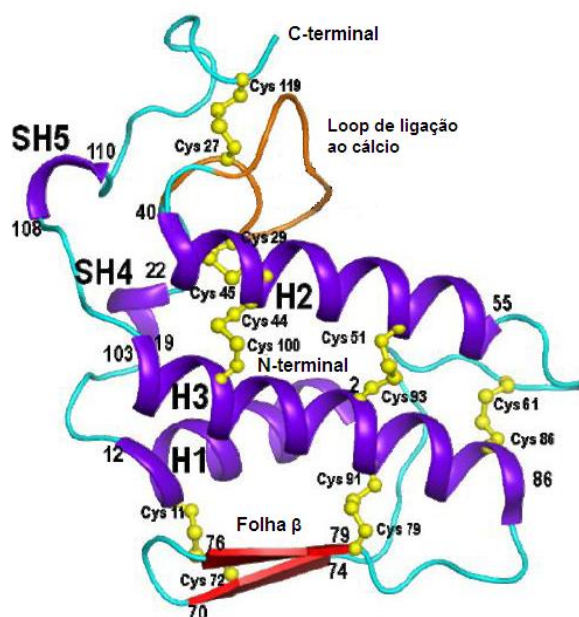


Figura 3. Enovelamento geral de PLA_{2S} do grupo IA em estrutura secundária. α -hélices estão indicadas na cor roxa e folhas β indicadas na cor vermelha. As pontes de dissulfeto são indicadas por ligações nas cores em amarelo (adaptado de Kang *et al.*, 2011).

Nas fosfolipases do grupo IIA, as estruturas cristalinas de um grande número de isoformas revelaram três α -hélices principais (**Figura 4**). Uma hélice H1 na porção N-terminal (resíduos 2-12), e duas hélices antiparalelas H2 (resíduos 40-55) e H3 (resíduos 90-108), que estão no núcleo da proteína. (PERBANDT *et al.*, 1997; TANG *et al.*, 1998; CHANDRA *et al.*, 2000; 2001; BANUMATHI *et al.*, 2001; GU *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2003; JASTI *et al.*, 2004). Há duas outras hélices curtas SH4 (resíduos 114-117) e SH5 (resíduos 121-125), bem como uma pequena cadeia de folhas β nos resíduos 74-78 e 81-84.

Existem dois loops funcionalmente relevantes nessas proteínas: o loop de ligação do cálcio (resíduos 25-35), onde uma molécula de água conservada está ligada às cadeias laterais dos resíduos His48 e Asp49 através de ligações de hidrogênio e um loop externo muito característico e flexível nos resíduos 14-23 (KANG *et al.*, 2011). As hélices H2 e H3 são de natureza anfipática, com as suas cadeias laterais hidrofílicas expostas ao solvente e as cadeias laterais hidrofóbicas voltadas para a face interna da proteína, com exceção dos quatro resíduos altamente conservados no sítio ativo (His48, Asp49, Tyr52 e Asp99).

Essa conformação estrutural é responsável pela formação do canal hidrofóbico, que começa a partir da superfície e se estende por toda a extensão da molécula, diagonalmente, ligando-se ao sítio ativo. As paredes deste canal são alinhadas por vários resíduos hidrofóbicos, incluindo Leu2, Phe5, Met8, Ile9, Tyr22, Cys29, Cys45, Tyr52, Lys69, Ala102, Ala103 e Phe106. A entrada deste canal é cercada por cadeias laterais de Trp31 e Lys69, sendo que o sítio ativo da molécula é uma cavidade semicircular na extremidade do canal hidrofóbico. (KANG *et al.*, 2011)

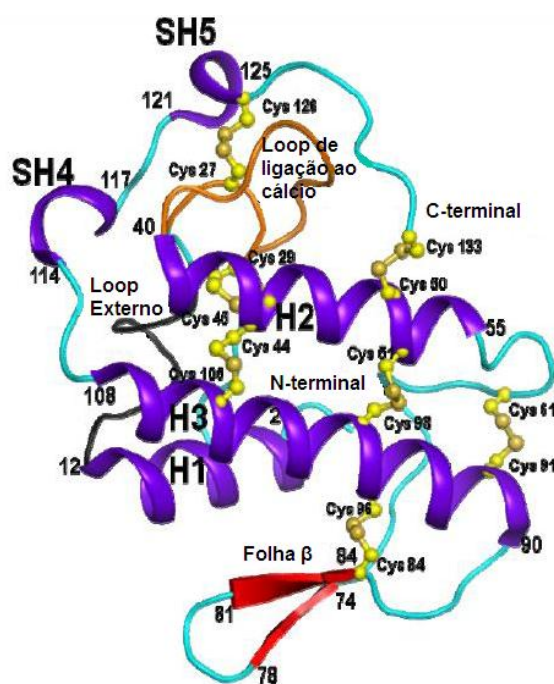


Figura 4. Enovelamento geral de PLA₂s do grupo IIA em estrutura secundária. As α -hélices estão indicadas na cor roxa e as folhas β indicadas por setas na cor vermelha. As pontes de dissulfeto são indicadas nas cores em amarelo (adaptado de Kang *et al.*, 2011).

As PLA₂s do grupo IIA, predominantemente de peçonhas de serpentes, também podem ser subdivididas em pelo menos três subclasses de acordo com o resíduo de aminoácido existente na posição 49, o que determina sua atividade catalítica, a saber: (a) PLA₂s Asp49, apresentam atividade catalítica elevada, (b) PLA₂s Ser49 com menor atividade catalítica, e (c) PLA₂s Lys49, Asn49 ou Arg49, que são enzimas cataliticamente inativas (SHIMOHIGASHI *et al.*, 1995; ARNI e WARD, 1996; OWNBY *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 2004a; DE PAULA *et al.*, 2009).

1.3. PLA₂ de peçonhas de serpentes: BnSP – 7

As peçonhas de serpentes são extremamente complexas, pois contêm uma variedade significativa de substâncias e compostos com atividade tóxicas e farmacológicas, que atuam coordenadamente na indução das alterações fisiopatológicas derivadas do envenenamento. (KOCHVA *et al.*, 1983; MACKESSY, 1988; BRAUD *et al.*, 2000; MACKESSY *et al.*, 2003; LU *et al.*, 2005).

Aproximadamente 90% dos constituintes da peçonha compreendem proteínas tóxicas ou não tóxicas (SOUZA *et al.* 2000). Das proteínas farmacologicamente ativas, destacam-se as fosfolipases A₂, presentes em abundância nos venenos de serpentes das famílias Colubridae (*lato sensu*), Elapidae e Viperidae (FRY e WÜSTER, 2004).

As fosfolipases A₂ (PLA₂s) estão entre os principais componentes destas peçonhas e, em adição ao seu papel de catalisador, elas mostram um largo espectro de efeitos farmacológicos, tais como anticoagulação, inibição ou indução da agregação plaquetária, cardiotoxicidade, neurotoxicidade, hipotensão arterial, aumento da permeabilidade microvascular. Ainda apresenta formação de edema, decorrentes da resposta inflamatória (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1997; KINI, 1997; HARRIS *et al.*, 2000; SINGH *et al.*, 2000; ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2004; SANTOS-FILHO *et al.*, 2008). Além disso, PLA₂s também estão associadas com necrose muscular, um importante efeito local induzido por algumas peçonhas de serpentes, que pode levar a perda permanente da função do tecido e consequente amputação do membro afetado (NISHIOKA e SILVEIRA, 1992).

A atividade catalítica das PLA₂s é crucial para que essas possam exercer os mais variados efeitos locais e sistêmicos observados após o envenenamento (GUTIÉRREZ e

LOMONTE, 1997; SOARES *et al.*, 2004a). No entanto, vários trabalhos demonstraram que tais sintomas também podem ser causados pela ação de PLA₂s Lys49, as quais são cataliticamente inativas (PÁRAMO *et al.*, 1998, SOARES *et al.*, 2000a, 2000b; CHACUR *et al.*, 2003, 2004).

Como foi demonstrado por Soares *et al.* (2000a, 2000b) e por Stábili *et al.* (2006), as Lys49-PLA₂ apresentam miotoxicidade. Além disso, são responsáveis por efeitos relacionados a desestabilização de membranas, como ruptura de lipossomos e também atividades citotóxicas (citolítica ou apoptose), bactericidas, antitumoral, mitogênicas e neuromusculares. Landucci *et al.* (1998) descreveram acerca da atividade edematogênica causada por PLA₂s Lys49 isoladas de *Bothrops jararacussu* (bothropstoxina-I) e *Bothrops pirajai* (chamado piratoxin-I), que induziram edema na pata e pele de ratos.

Recentemente, Setúbal *et al.* (2013) demonstraram a ação *in vitro* da BaltTX-I (Lys49-PLA₂ isolada da peçonha de *Bothrops alternatus*) sobre macrófagos, estando, desta forma, relacionada a processos inflamatórios. Esses estudos mostram a versatilidade dos efeitos farmacológicos decorrentes da ação de Lys49-PLA₂. É descrito que essa ação está diretamente relacionada com a forma dimerica das PLA₂-Lys49 em solução (FRANCIS *et al.*, 1991; DA SILVA GIOTTO *et al.*, 1998; DE OLIVEIRA *et al.*, 2001). Estudos cristalográficos e espectroscópicos de BthTx-I, uma PLA₂-Lys49 da peçonha de *Bothrops jararacussu*, mostraram que a interface dos monômeros forma uma "dobradilha" que resulta nas formas "aberta" e "fechada" do dímero (**Figura 5**). Demonstrou-se que essa transição na estrutura quaternária do dímero provoca a mudança de posição da região C-terminal (DA SILVA GIOTTO *et al.*, 1998), sugerindo o envolvimento desta região no modelo proposto de danificação da membrana independente de cálcio. Experimentos com peptídeos sintéticos correspondentes aos resíduos de aminoácidos 115 – 129 (C-terminal) destacaram a importância desta região, bem como a presença de aminoácidos básicos e hidrofóbicos em posições específicas para a atividade miotóxica das PLA₂s-Lys49 (LOMONTE *et al.*, 1999; CHIOATO *et al.*, 2002; LOMONTE *et al.*, 2003a; LOMONTE *et al.*, 2003b; CHIOATO *et al.*, 2007). É observada a ação dessa região C-terminal na interação com membranas de lipossomos, o que provoca uma rápida liberação do conteúdo aquoso dos mesmos (RUFINI *et al.*, 1992; PEDERSEN *et al.*, 1995, DE OLIVEIRA *et al.*, 2001, WARD *et al.*,

2002) e na interação com plaquetas, inibindo a agregação plaquetária (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

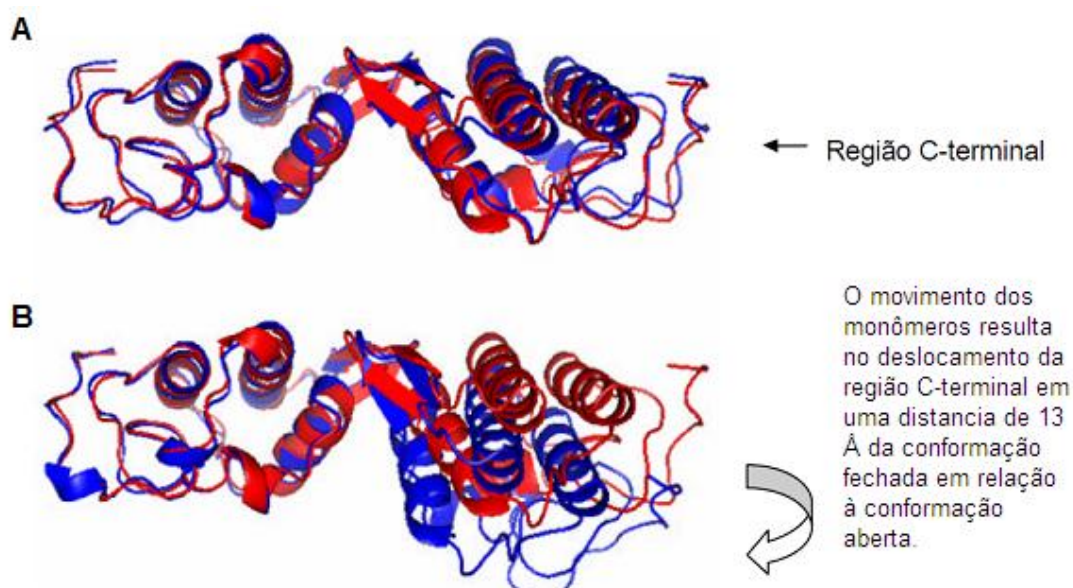


Figura 5: Sobreposição das estruturas cristalográficas das proteínas miotoxina II de *Bothrops asper* (em vermelho) e bothopstoxina I de *Bothrops jararacussu* (em azul). (A) estrutura dimérica “aberta” e (B) estrutura dimérica “fechada”. O movimento dos monômeros resulta no deslocamento da região C-terminal em uma distância de 13 Å em relação à conformação aberta. (adaptado de Aragão, 2005).

Há um novo modelo, chamado de “dímero alternativo”, na qual, a partir da análise estrutural comparativa de variantes de Lys49-PLA₂s, foi demonstrado dois padrões diferentes de conformação oligomérica que estão relacionados com a presença ou a ausência de ligantes no canal hidrofóbico (DOS SANTOS *et al.*, 2009). Além disso, é proposto que o local responsável pela miotoxicidade é composta pelos resíduos Lys20, Lys115 e Arg118, devido a porção C-terminal estar na interface dimérica. Também é sugerido a importância do resíduo Tyr119 no perfil miotóxico dessas toxinas (DOS SANTOS *et al.*, 2009)

A BnSP - 7 é uma importante fosfolipase A₂ Lys49 isolada a partir da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (RODRIGUES *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2000b), serpente que segundo a classificação de Silva (2004) passou a ser chamada de *Bothrops pauloensis* (VALLE e BRITES, 2008). Em 2009, de acordo com uma nova classificação da sociedade brasileira de herpetologia passou a ser denominada *Bothropoides pauloensis* (FENWICK, 2009), no entanto em 2012, essa serpente volta a ser denominada *Bothrops pauloensis* (CARRASCO, 2012).

Esta enzima foi descrita como uma proteína cataliticamente inativa com massa molecular em torno de 14 kDa e estrutura semelhante a de outras miotoxinas Lys49, ou seja, apresenta muitos resíduos básicos e hidrofóbicos em sua composição de aminoácidos. Possui também resíduos de Gly30, Gly32, His48, Lys49, Asp99 e as regiões conservadas, bem como uma serina na região N-terminal. Esta toxina possui um ponto isoelétrico de 8,8 e pode induzir necrose em fibras musculares de ratos (RODRIGUES *et al*, 1998; SOARES *et al*, 2000b; MAGRO *et al.*, 2003), Além disso, essa proteína induz morte bacteriana em *E. coli*, promove bloqueio da contração neuromuscular, evidenciada também por aumento nas taxas de creatina cinase (CK) plasmática (SOARES *et al*, 2000b). Oliveira *et al.* (2009) demonstraram a sua capacidade de induzir edema e miotoxicidade a partir da avaliação do processo de lesão e regeneração tecidual induzido por essa toxina. Foi analisada a progressão da lesão até duas semanas após a sua inoculação em músculo gastrocnêmio de camundongos. Nas primeiras horas foram evidenciados processos característicos de lesão tecidual, como edema, infiltrado inflamatório e necrose. Após 2 semanas foi evidenciado uma incompleta e pobre regeneração com a presença de tecido conjuntivo fibroso em áreas reduzidas.

Estruturalmente, essa enzima assemelha-se à estrutura de outras miotoxinas Lys49-PLA₂, com a presença de sete pontes dissulfeto e elementos de estrutura secundária conservados. Como mostrado na **Figura 6**, a estrutura consiste em uma α -hélice N-terminal, um loop de ligação Ca²⁺, duas hélices anti-paralelas 2 e 3, uma folha- β anti-paralela e região C-terminal (MAGRO *et al.*, 2003).

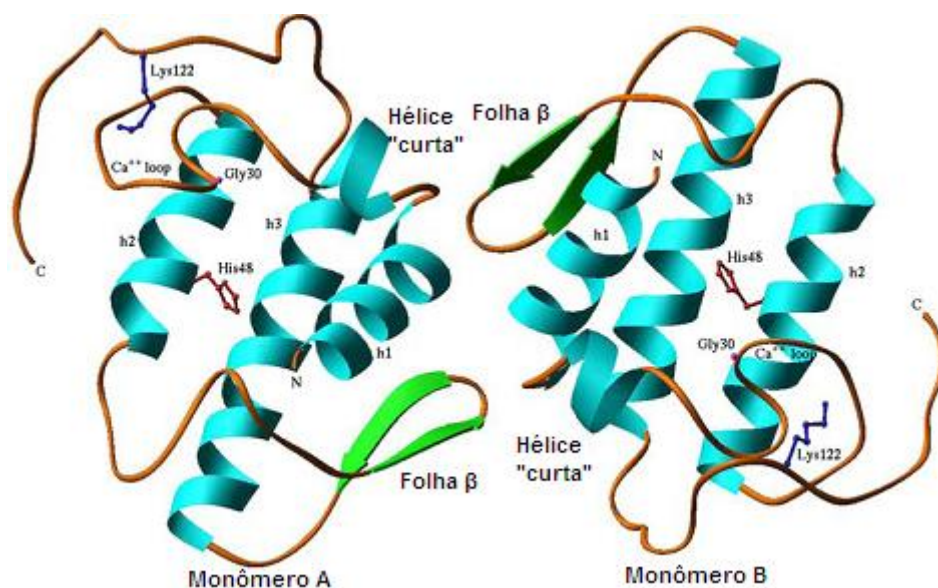


Figura 6. Estrutura da BnSP-7. α -hélices estão indicadas na cor azul e folhas β indicadas na cor verde por setas. Gly30, His48 e Lys122 do sítio ativo estão representados em modelo de bola-bastão (adaptado de Carson, 1997).

1.4. Expressão de proteínas heterólogas

1.4.1. Comparação entre sistemas de expressão em *E. coli* e *P. pastoris*

A expressão de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos tem se mostrado uma técnica fundamental na biologia molecular moderna (QORONFLECH *et al.*, 2007). A produção de proteínas heterólogas pode ser obtida em diferentes hospedeiros como, bactérias, leveduras e células de mamíferos (MAKRIDES, 1996) sendo que, nas últimas três décadas, a bactéria *Escherichia coli* tem sido usada extensivamente nesse processo. No entanto, a ampla aplicação desse sistema com proteínas derivadas de genomas eucariotos que requerem modificações pós-traducionais tem sido um problema porque esses microorganismos considerados mais simples não possuem maquinaria intracelular para proporcionar esses resultados (DALY e HEARN, 2005), assim como não é adequada a utilização de *E. coli* em estudos de expressão de proteínas com um número elevado de pontes dissulfeto (WHITE, 1994).

Sendo *E. coli* um organismo procarioto, torna-se limitante os tipos de proteínas que podem ser expressas, devido a incapacidade de enovelamento correto de algumas

proteínas heterólogas, por conta de concentração inadequada de chaperonas intracelulares (COLE, 1996) ou redução no citoplasma da bactéria (LI *et al.*, 2001). Assim, os produtos proteicos expressos corriqueiramente podem se apresentar insolúvel, não enovelado ou sem o enovelamento condizente com a proteína nativa e ainda em corpos de inclusão, sendo necessários passos adicionais de solubilização e re-enovelamento (MARSTON, 1986; MAKRIDES, 1996). Além disso, as proteínas produzidas por esse sistema tendem a manter uma metionina amino-terminal, o que pode afetar a estabilidade da proteína recombinante ou ainda causar imunogenicidade (CHAUDHURI *et al.*, 1999; TAKANO *et al.*, 1999).

Visto que ocasionalmente são requeridos passos posteriores de re-enovelamento de proteínas expressas e presentes em corpos de inclusão, a otimização das condições de *refolding* é um aspecto importante nesse âmbito, pois estes podem resultar em perdas significativas, menor produtividade e consequente aumento dos custos de produção da proteína expressa (WANG *et al.*, 2000). Com isso, uma grande variedade de proteínas que não podem ser expressas em *E. coli* no nível correto de maturação pós-traducional foram subsequentemente produzidas em levedura metilotrófica, *Pichia pastoris* (MONSALVE *et al.*, 1999). Os sistemas de expressão de levedura são utilizados satisfatoriamente há mais de 20 anos para a produção e secreção de proteínas recombinantes de origem humana, animal, vegetal, fúngica, bacteriana e viral (DEMAIN e VAISHNAV, 2009).

1.4.2. Sistema de expressão em *P. pastoris*

Sistemas de expressão em *P. pastoris* oferecem vantagens significativas sobre os sistemas de expressão de *E. coli* para a produção de muitas proteínas heterólogas eucarióticas, como mecanismos de modificação pós-traducional. Esta característica é particularmente relevante para proteínas alvo que contêm ligações múltiplas dissulfeto ou requerem glicosilação, fosforilação, a ausência de metionina amino-terminal ou não formação de oligômero para a montagem correta da proteína madura. Além disso, esse sistema permite a segregação da proteína autêntica na forma solúvel e é capaz de produzir grandes quantidades da proteína recombinante (DALY e HEARN, 2005).

Entretanto, para que a expressão de proteínas heterólogas através desse sistema ocorra de maneira efetiva, é necessário planejamento acerca de aspectos essenciais nesse processo, tais como a escolha de uma linhagem específica, determinada pelo genótipo e características fenotípicas da linhagem, de acordo com aplicação desejada. As linhagens GS115, SMD1168 e KM71H, por exemplo, apresentam um defeito no gene da histidina desidrogenase (*his4*), o que possibilita a seleção dos transformantes com base em sua capacidade de crescer em meios pobres em histidina (INAN e MEAGHER, 2001).

Essas linhagens de *P. pastoris* são bastante favoráveis na produção de proteínas recombinantes devido à presença de uma região promotora que codifica a primeira enzima da via de utilização de metanol, a álcool oxidase 1 (AOX1). Esta enzima, em conjunto com outros componentes da via de utilização de metanol, é estritamente regulada ao nível da transcrição (ELLIS *et al.*, 1985; CREGG *et al.*, 1989).

As cepas GS115 e SMD1168 contêm uma cópia funcional do gene da álcool oxidase 1 (AOX1), responsável por cerca de 85% da utilização de metanol pela enzima álcool oxidase. Com isso, essas cepas têm um fenótipo na utilização de metanol designado como Mut⁺ (INAN e MEAGHER, 2001).

A linhagem KM71H, no entanto, contém um gene para AOX1 não funcional (*aox1*) e depende da produção da enzima álcool oxidase a partir de um gene alternativo chamado AOX2. A enzima AOX2 tem a mesma atividade específica da AOX1, mas tem um nível de expressão muito baixo (promotor mais fraco) e com isso, o consumo do metanol ocorre lentamente, levando a denominação desse fenótipo como Mut^s (CREGG *et al.*, 1993; INAN e MEAGHER, 2001).

A expressão de muitos genes da via do metanol em *P. pastoris*, especialmente AOX1 e AOX2, é reprimida pela glicose, glicerol e etanol, e fortemente induzido por metanol. Em células com adição de metanol, em taxas de crescimento limítrofe, os níveis de AOX1 podem chegar a mais de 30% de proteína solúvel total (CREGG *et al.*, 2000).

1.4.3 Metabolismo do metanol

As enzimas necessárias envolvidas no sistema de expressão de *P. pastoris* apenas são ativas quando há presença de níveis substanciais de metanol em células cultivadas (EGLI *et al.*, 1980; VEENHUIS *et al.*, 1983), sendo que a utilização de metanol requer uma nova via metabólica que envolve várias enzimas específicas (VEENHUIS *et al.*, 1983).

A enzima álcool oxidase (AOX) catalisa o primeiro passo na via de utilização de metanol, a oxidação de metanol em formaldeído e peróxido de hidrogênio (**Figura 7**). No peroxissomo, a enzima catalase degrada o peróxido de hidrogênio formado em oxigênio e água. Uma porção do formaldeído gerado pelo AOX sai do peroxissomo e é oxidado a dióxido de carbono e ácido fórmico por duas desidrogenases citoplasmáticas, reações que são uma fonte de energia para as células que crescem em metanol (CEREHINO e CREGG, 2000).

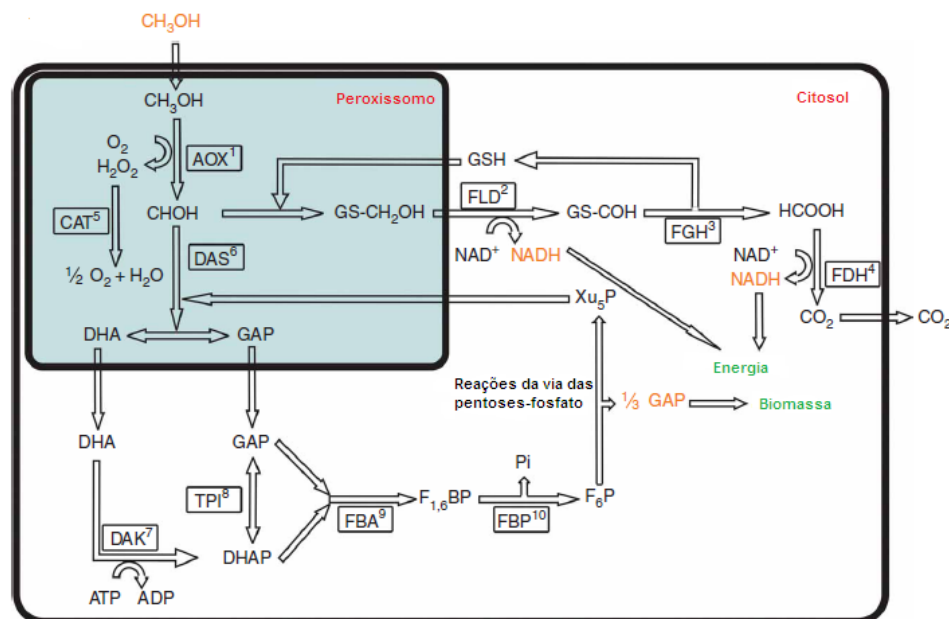


Figura 7. Via do metanol em *P. pastoris*. AOX¹, álcool oxidase; FLD², formaldeído desidrogenase; FGH³, S-formilglutathiona hidrolase; FDH⁴, formiato desidrogenase; CAT⁵, catalase; DAS⁶, dihidroxiacetona sintase; DAK⁷, dihidroxiacetona quinase; TPI⁸, triosefosfato isomerase; FBA⁹, frutose-1,6- bifosfato aldolase; FBP¹⁰, frutose-1,6- bifosfatase; DHA, dihidroxiacetona; GAP, gliceraldeído-3-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; F_{1,6}BP, frutose- 1,6- bifosfato; F₆P, frutose-6- fosfato; Pi , fosfato; Xu₅P, xilulose-5- fosfato; GSH, glutationa (adaptado de DE SCHUTTER *et al.*, 2009).

O restante do formaldeído é assimilado para formar os constituintes celulares através de uma passagem cíclica que começa com a condensação de formaldeído com

xilulose 5-monofosfato, numa reação catalisada por uma terceira enzima peroxissomal: a dihidroxiacetona sintase (DAS). Os produtos desta reação, gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona, saem do peroxissoma, induzindo a via citoplasmática que regenera xilulose-5-monofosfato e, para cada três ciclos, uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato. Duas das enzimas da via de metanol, AOX e DAS, estão presentes em níveis elevados em células cultivadas em metanol, mas não são detectáveis nas células cultivadas na maioria das outras fontes de carbono, como por exemplo, glicose, glicerol, ou etanol (CEREHINO e CREGG, 2000).

1.4.4. Vetores de expressão

Em geral, os vetores no sistema de expressão de *P. pastoris* foram construídos como vetores de transporte *Escherichia coli/Pichia pastoris*, pois contém uma origem de replicação para manutenção do plasmídeo em *E. coli* e marcadores funcionais dos dois organismos (CEREHINO e CREGG, 2000).

A maioria dos vetores de expressão tem um cassete de expressão constituída por um fragmento de AOX1 de 0,9-kb (**Figura 8**), composto por sequências do promotor 5' e um segundo fragmento curto derivado de AOX1 com as sequências necessárias para a terminação da transcrição (KOUTZ *et al.*, 1989). Entre o promotor e sequências de terminação está um local de clonagem múltipla (MCS) para a inserção da sequência heteróloga a ser codificada. No gene nativo AOX1, a fase aberta de leitura (ORF) da álcool oxidase é precedido por uma longa e incomum (116 nucleotídeos) região 5' não traduzida (ELLIS *et al.*, 1985).

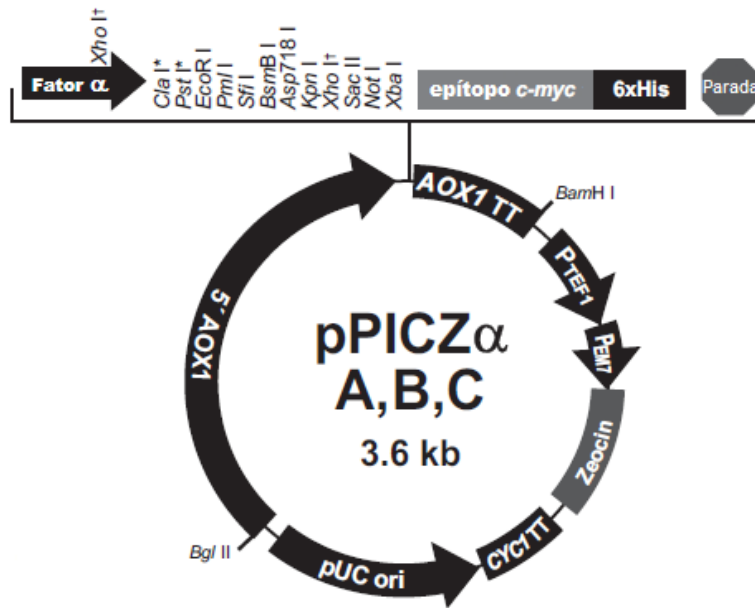


Figura 8. Diagrama de um vetor de expressão pPICZ α (Invitrogen), contendo os sítios das enzimas de restrição; a região fator alfa, responsável pelo direcionamento da proteína recombinante ao sobrenadante; a marca de seleção que confere resistência a zeocina; o promotor AOX1; os resíduos de histidina e o epítipo c-myc, responsável pelo reconhecimento por anticorpos específicos.

1.4.5. Integração ao genoma de *P. pastoris*

P. pastoris é transformada por integração do cassete de expressão no *locus* específico do cromossomo, a fim de gerar transformantes geneticamente estáveis (VUORELA *et al.*, 1997; STRATTON *et al.*, 1998).

O tamanho do plasmídeo é um dos fatores que podem também afetar a estabilidade no hospedeiro uma vez que grandes plasmídeos episômicos podem ser perdidos durante repetidas gerações, por instabilidade na mitose (WHITE *et al.*, 1995; GLEESON *et al.*, 1998). Além disso, é importante que os transformantes contendo plasmídeos episomais sejam cultivados em meios de seleção com antibióticos, para que se mantenha a população de células transformadas (WHITE *et al.*, 1995). Portanto, o desenvolvimento de linhagens de expressão geneticamente estáveis, com marcadores selecionáveis que permitem a detecção dos transformantes é bastante relevante e altamente desejável (GLEESON *et al.*, 1998).

1.4.6. Via de enovelamento

O enovelamento de proteínas começa com a formação de estruturas secundárias (HLODAN e HARTL, 1994) e a rápida formação de ligações dissulfeto no retículo endoplasmático (HOLST *et al.*, 1996).

Muitas proteínas, especialmente aquelas que são naturalmente secretadas, contêm uma pró-região, necessária em alguns casos de oligomerização e para o enovelamento correto. O mRNA da pró-região também pode ajudar na estabilização do mRNA de proteínas pela formação de estruturas secundárias locais e, portanto, resistir à degradação (ROMANOS *et al.*, 1992). Embora a pró-região seja proteoliticamente removida para liberar a proteína madura, a expressão das proteínas correspondentes sem essa pró-região pode resultar na saída lenta do retículo endoplasmático e, em alguns casos, a formação de produto mal enovelado ou sem *folding* (OKA *et al.*, 1999).

A pró-proteína é então transportada para o complexo de Golgi, onde a pró-região é removida por endo-peptidases, como a kex2 ou furina. Esse corte também pode ocorrer através de amino-peptidases (DAVEY *et al.*, 1998). A partir do Golgi, as proteínas recombinantes são empacotadas em vesículas secretoras e, em seguida, distribuídas na superfície da célula (ROMANOS *et al.*, 1992).

Visando a liberação de proteínas direto na via secretória, é necessário uma sequência sinal específica. A sequência sinal é geralmente um pré-sequência amino-terminal curta que contém uma região amino-terminal carregada seguida por numerosos resíduos hidrófobos (6 a 15 aminoácidos) e um local de clivagem reconhecido por peptidases (ROMANOS *et al.*, 1992; DALY e HEARN, 2005). Para isso, é mais desejável a utilização de cepas Mut^s para expressão porque a taxa de indução da proteína é lenta, assim como o enovelamento da proteína recombinante (ROMANOS, 1995).

1.5. Clonagem e expressão de toxinas de peçonhas de serpentes

A obtenção de moléculas recombinantes com o auxílio de técnicas de biologia molecular, facilitam os estudos que visam elucidar os possíveis mecanismos de ação

destas toxinas devido à alta produtividade e versatilidade desse mecanismo (ROBERTO *et al.*, 2004a; CARDOSO *et al.*, 2011). A partir da aquisição dos modelos moleculares e de estudos funcionais desses compostos, abrem-se caminhos para a compreensão de quais domínios estruturais são responsáveis pelas diferentes atividades apresentadas por estas enzimas, além de reduzir o sofrimento e estresse causado às serpentes na extração da peçonha, visto que muitas proteínas são encontradas em concentrações muito baixas na peçonha, tornando essa técnica inviável em alguns casos.

Alguns trabalhos de clonagem e expressão de PLA₂s de peçonhas ofídicas relevaram que estas proteínas recombinantes apresentam geralmente as mesmas características estruturais e funcionais quando comparadas às proteínas nativas. Armugam *et al.* (1997) clonaram, caracterizaram e expressaram em *E.coli* três isoformas de PLA₂ da peçonha de *Naja naja sputatrix*, demonstrando que essas apresentaram atividade fosfolipásica. De forma semelhante, Chang, Wu e Chang (1996) expressaram uma PLA₂ de *Bungarus multicinctus* confirmando a sua atividade catalítica. Roberto *et al.* (2004a, 2004b) clonaram e expressaram em *E. coli* um gene de uma PLA₂ extraído da glândula de *Bothrops jararacussu*, e mostraram que a proteína recombinante possui as mesmas atividades enzimáticas e farmacológicas da proteína nativa. Outra abordagem bastante interessante nesse aspecto foi a clonagem e expressão de genes mutantes da bothropstoxina-I (BthTX-I). Este trabalho demonstrou a possibilidade de substituição de aminoácidos visando aumentar a ação ou diminuir a toxicidade desses compostos em algum aspecto, além de possibilitar elucidar alguns mecanismos de atuação destas enzimas (SÁ *et al.*, 2004)

Essas pesquisas utilizam técnicas de biologia molecular como ferramentas para buscar um melhor entendimento na relação estrutura-função de moléculas. Assim, é gerado não somente conhecimentos em várias áreas do saber, mas também abrem-se caminhos para o desenvolvimento e utilização de fármacos no tratamento de acidentes ofídicos, ou no tratamento de algumas patologias. Destaca-se ainda nas PLA₂ o importante papel que desempenham em muitos processos biológicos, como a sinalização e crescimento celular, incluindo a produção de mediadores pró-inflamatórios lipídicos, tais como prostaglandinas e leucotrienos. A atividade e expressão de várias isoformas de PLA₂ são aumentadas em vários tumores humanos, sugerindo que estas enzimas têm um papel central no desenvolvimento e progressão

tumoral e podem ser alvos para fármacos no tratamento dessa patologia. Por outro lado, algumas PLA₂ isoladas de peçonhas de Viperidae são capazes de induzir a atividade anti-tumoral (RODRIGUES *et al.*, 2009). BnSP-7 é uma PLA₂ com potencialidade terapêutica interessante, como já demonstrado por suas ações bactericida (SOARES *et al.*, 2000b) e anti-parasitária (NUNES *et al.*, 2013). Dessa forma, a clonagem e expressão, bem como a análise funcional dessa proteína são de considerável importância para os estudos no âmbito terapêutico.

2. Referências Bibliográficas

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M.; FULY, A. L.; CORRÊA, F. M. A.; ROSA, J. C.; GREENE, L. J.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 from Bothrops jararacussu snake venom, **Biochem. Pharmacol.** v. 64, p. 723–732, 2002.

ARAGÃO, E. A. **Efeito bactericida de Fosfolipases A2-Lys49: o papel da região C-terminal na atividade de Bothropstoxina-I em membranas biológicas e artificiais.** 2005. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Química) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2005.

ARMUGAM, A.; EARNEST, L.; CHUNG, M. C.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; TAN, C. H.; TAN, N. H.; JEYASEELAN, K. Cloning and characterization of cDNAs encoding three isoforms of phospholipase A2 in Malayan spitting cobra (*Naja naja sputatrix*) venom. **Toxicon.** v. 35(1), p. 27-37, 1997.

ARNI, R. H.; WARD, R. J. Phospholipase A2. A structural review. **Toxicon.** v. 34, p. 827–841, 1996.

BANUMATHI, S.; RAJASHANKAR, K. R.; NOTZEL, C.; ALEKSIEV, B.; SINGH, T. P.; GENOV, N.; BETZEL, C. Structure of the neurotoxic complex vipoxin at 1.4 Å resolution. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.** v. 57, p. 1552–1559, 2001.

BERG, O. G.; GELB, M. H.; TSAI, M. D.; JAIN, M. K. Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A(2)-paradigm. **Chem Rev.** v. 101, p. 2613–2654, 2001.

BOWTON, D. L.; SEEDS, M. C.; FASANO, M. B.; GOLDSMITH, B.; BASS, D. A. Phospholipase A2 and arachidonate increase in bronchoalveolar lavage fluid after inhaled antigen challenge in asthmatics. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.** v. 155, p. 421–425, 1997.

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

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 biochemistry. **Cardiovasc. Drugs Ther.** v. 23, p. 49–59, 2009a.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure / function, mechanism, and signaling. **J Lipid Res.** v. 50(Suppl), p. 237–242, 2009b.

CARDOSO, K. C.; DA SILVA, M. J.; COSTA, G. G.; TORRES, T. T.; DEL BEM, L. E.; VIDAL, R. O.; MENOSSI, M.; HYSLOP, S. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics**, v. 11, p. 605, 2011.

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

CARSON, M.; RIBBONS. Methods. **Enzymol.** v. 277, p. 493–505. 1997.

CHACUR, M.; LONGO, I.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B.; GUERRA, J. L.; TEIXEIRA, C. F.; CURY, Y. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. **Toxicon.** v. 41(6), p. 667-678, 2003.

CHACUR, M.; MILLIGAN, E. D.; SLOAN, E. M.; WIESELER-FRANK, J.; BARRIENTOS, R. M.; MARTIN, D.; POOLE, S.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; MAIER, S. F.; CURY, Y.; WATKINS, L. R. Snake venom phospholipase A2s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. **Pain.** v. 108(1-2), p. 180 -191, 2004.

CHANDRA, V.; KAUR, P.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T. P. Three-dimensional structure of a presynaptic neurotoxic phospholipase A2 from *Daboia russelli pulchella* at 2.4 Å resolution. **J Mol Biol.** v. 296, p. 1117–1126, 2000.

CHANDRA, V.; KAUR, P.; JASTI, J.; BETZEL, C.; SINGH, T. P. Regulation of catalytic function by molecular association: structure of phospholipase A2 from *Daboia russelli pulchella* (DPLA2) at 1.9 Å resolution. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.** v. 57, p. 1793–1798, 2001.

CHAUDHURI, T. K.; HORII, K.; YODA, T.; ARAI, M.; NAGATA, S.; TERADA, T. P.; UCHIYAMA, H.; IKURA, T.; TSUMOTO, K.; KATAOKA, H.; MATSUSHIMA, M.; KUWAJIMA, K.; KUMAGAI, I. Effect of the extra Nterminal methionine residue on the stability and folding of recombinant alpha lactalbumin expressed in *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.** v. 285, p. 1179-1194. 1999.

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. **Biochem. J.**, v.366, p. 971-976, 2002.

CHIOATO, L.; ARAGÃO, E.A.; FERREIRA, T.L.; MEDEIROS, A.I.; FACCIOLI, L.H.; WARD, R.J. Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A2 by scanning alanine mutagenesis. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1768, p.1247-1257, 2007.

CHANG, L. S.; WU, P. F.; CHANG, C. C. Expression of Taiwan banded krait phospholipase A2 in *Escherichia coli*, a fully active enzyme generated by hydrolyzing with aminopeptidase. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 23;225(3), p. 990-996, 1996.

COLE, P. A. Chaperone-assisted protein expression. **Structure.** v. 4, p. 239-242. 1996.

CREGG, J. M.; MADDEN, K. R.; BARRINGER, K. J.; THILL, G. P.; STILLMAN, C. A. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Mol Cell Biol** v. 9, p. 1316–1323, 1989.

CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **BioTechnology.** v. 11, p. 905-910. 1993.

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Mol Biotechnol.** v. 16, p. 23–52, 2000.

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

DA SILVA-GIOTTO, M. T.; GARRATT, R. C.; OLIVA, G.; MASCARENHAS, Y. P.; GIGLIO, J. R.; CINTRA, A. C. O.; DE AZEVEDO-JR, W. F.; ARNI, R. K.; WARD, R. J. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes I bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A2 homologue. **Prot. Struct. Funct. Genet.** v. 30, p. 442 – 454, 1998.

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **J. Mol. Recognit.** v. 18, p. 119–138, 2005.

DAVEY, J.; DAVIS, K.; HUGHES, M.; LADDS, G.; POWNER, D. The processing of yeast pheromones. **Sem. Cell Dev. Biol.** v. 9, p. 19-30. 1998.

DE OLIVEIRA, A. H.; GIGLIO, J. R.; ANDRILAO-ESCARSO, S. H.; ITO, A. S; WARD, R. J. A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A2 abolishes Ca²⁺ independent membrane damaging activity. **Biochemistry.** v. 40(23), p. 6912-6920, 2001.

DE PAULA, R. C.; CASTRO, H. C.; RODRIGUES, C. R.; MELO, P. A.; FULY, A. L. Structural and pharmacological features of phospholipases A2 from snake venoms. **Protein Pept Lett.** v. 16, p. 899-907, 2009.

DE SCHUTTER, K.; LIN, Y. C.; TIELS, P.; VAN HECKE, A.; GLINKA, S.; WEBER-LEHMANN, J.; ROUZE, P.; DE PEER, Y. V.; CALLEWAERT, N. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. **Nature Biotechnology**. v. 27, p. 561-U104. 2009.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol. Adv.** v. 27, p. 297-306. 2009.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 269(18), p. 13057-13060, 1994.

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**. v. 167, p. 106–116. 2009.

EGLI, T.; VAN DIJKEN, J. P.; VEENHUIS, M.; HARDER, W.; FIECHTER, A. Methanol metabolism in yeasts: regulation of the synthesis of catabolic enzymes. *Arch. Microbiol.* 124, 115-121. 1980.

ELLIS, S. B.; BRUST, P. F.; KOUTZ, P. J.; WATERS, A. F.; HARPOLD, M. M.; GINGERAS, T. R. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Mol. Cell. Biol.** v. 5, p. 1111-1121. 1985.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET JR., 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**. v. 156, p. 617-640, 2009.

FRANCIS, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; KAISER, I. I. Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A2. **Arch Biochem Biophys**. v. 284, p. 352-359, 1991.

FREMONT, D. H.; ANDERSON, D. H.; WILSON, I. A.; DENNIS, E. A. XUONG, N. H. Crystal structure of phospholipase A2 from Indian cobra reveals a trimeric association. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 90, p. 342–346, 1993.

FRY, B. G.; WÜSTER, W. Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. **Mol. Biol. Evol.** v. 21, p. 870–883, 2004.

FRY, B. G.; SCHEIB, H.; VAN DER WEERD, L.; YOUNG, B.; MCNAUGHTAN, J.; RAMJAN, S. F. R.; VIDAL, N.; POELMANN, R. E.; NORMAN, J. A. Evolution of an arsenal. Structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). **Mol. Cel. Proteomics**. v. 7, p. 215–246, 2008.

GARCIA-DENEGRI, M. E.; ACOSTA, O. C.; HUANCHUIRE-VEJA, S.; MARTINS-DESOUZA, D.; MARANGONI, S.; MARUÑAK, S. L.; TEIBLER, G. P.; LEIVA, L. C.; PONCE-SOTO, L. A.

Isolation and functional characterization of a new acidic PLA(2) BaSpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. **Toxicon**. v. 56(1), p. 64-74, 2010.

GLEESON, M. A. G.; WHITE, C. E.; MEININGER, D. P.; KOMIVES, E. A. Generation of protease-deficient strains and their use in heterologous protein expression. **Methods Mol. Biol.** v. 103, p. 81-94. 1998.

GU, L.; ZHANG, H.; SONG, S.; ZHOU, Y.; LIN, Z. Structure of an acidic phospholipase A2 from the venom of *Deinagkistrodon acutus*. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**. v. 58, p. 104–110, 2002.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipases A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms, in: *Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. **John Wiley and Sons**. pp. 321-352, 1997.

HARRIS, J. B.; GRUBB, B. D.; MALTIN, C. A.; DIXON, R. The neurotoxicity of the venom phospholipases A2, notexin and taipoxin. **Exp. Neurol.** v. 161, p. 517-526, 2000.

HIGUCHI, D. A.; BARBOSA, C. M. V.; BINCOLETTI, C.; CHAGAS, J. R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; PESQUERO, J. L. Purification and partial characterization of two phospholipase A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochemie**. v. 89, p. 319-328, 2007.

HLODAN, R.; HARTL, U. F. How the protein folds in the cell. In *Mechanisms of Protein Folding*, Pain RH (ed.). **Oxford University Press: New York**. P. 194–228. 1994.

HOLST, B.; BRUUN, A. W.; KIELLANDBRANDT, M. C.; WINTHER, J. R. Competition between folding and glycosylation in the endoplasmic reticulum. **EMBO J.** v. 15, p. 3538-3546. 1996.

INAN, M.; MEAGHER, M. M. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. **J. Biosci. Bioengng.** v. 92, p. 585-589. 2001.

JABEEN, T.; SINGH, N.; SINGH R. K.; ETHAYATHULLA A. S.; SHARMA, S.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T. P. Crystal structure of a novel phospholipase A2 from *Naja naja sagittifera* with a strong anticoagulant activity. **Toxicon**. v. 46, p. 865–875, 2005.

JABEEN, T.; SINGH, N.; SINGH, R. K.; JASTI, J.; SHARMA, S.; KAUR, P.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T. P. Crystal structure of a heterodimer of phospholipase A2 from *Naja naja sagittifera* at 2.3 Å resolution reveals the presence of a new PLA2-like protein with a novel Cys 32-Cys 49 disulphide bridge with a bound sugar at the substrate-binding site. **Proteins**. v. 62, p. 329–337, 2006.

JASTI, J.; PARAMASIVAM, M.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T. P. Structure of an acidic phospholipase A2 from Indian saw-scaled viper (*Echis carinatus*) at 2.6 Å resolution reveals a novel intermolecular interaction. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**. v. 60, p. 66–72, 2004.

KANG, T. S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M. T.; SINHA, M.; KUMAR, R. P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; *et al.* Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS J.** v. 278, p. 4544–4576, 2011.

KINI, R. M. Phospholipase A2: a complex multifunctional protein puzzle, in: R.M. Kini (Ed.), **Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism**, Wiley, Chichester. pp. 1–28, 1997.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon.** v. 42, p. 827-840, 2003.

KOCHVA, E.; NAKAR, O.; OVADIA, M. Venom toxins: plausible evolution from digestive enzymes. **Am. Zool.** v.23, p. 427–430, 1983.

KOUTZ, P.; DAVIS, G. R.; STILLMAN, C.; BARRINGER, K.; CREGG, J.; THILL, G. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. **Yeast.** v. 5, p. 167-177. 1989.

LANDUCCI, E. C.; CASTRO, R. C.; PEREIRA, M. F.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A2 homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur. J. Pharmacol.** v.343(2/3), p. 257–263, 1998.

LI, Z. J.; XIONG, F.; LIN, Q. S.; D'ANJOU, M.; DAUGULIS, A. J.; YANG, D. S. C.; HEW, C. L. Low temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. **Protein Express. Purif.** v. 21, p. 438-445. 2001.

LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; ÂNGULO, Y.; GORVEL, J.P.; MORENO, E. Expression of myotoxicity and enhanced membrane-damaging activity by Tyr Trp-substituted peptide 115-129 of myotoxin II, a Lys49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1461, p.19-26, 1999.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SANTAMARIA C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115–129 in Lys49 myotoxic phospholipases A2 from snake venoms. **Toxicon**, v.42, p.307-312, 2003a.

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. **Toxicon**, v.42, p.885-901, 2003b.

LU, Q.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. Snake venoms and hemostasis. **J. Thromb. Haemostatis.** v. 3(8), p. 1791–1799, 2005.

MACKESSY, S. P. Venom ontogeny in the Pacific rattlesnakes *Crotalus viridis helleri* and *C.v. oreganus*. **Copeia.** v. 1, p. 92–101, 1988.

MACKESSY, S. P.; WILLIAMS, K.; ASHTON, K. G. 2003. Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotalus oreganus concolor*: a case of venom paedomorphosis? **Copeia**. v. 4, p. 769–782, 2003.

MAGRO, A. J.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M. Crystal structures of BnPS-7 and BnSP-6, two Lys-49-phospholipases A2: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 311, p. 713–720, 2003.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiological reviews**. v. 60, p. 512-538, 1996.

MARSTON, F. A. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. **Biochem. J.** v. 240, p. 1-12. 1986.

MONSALVE, R. I.; LU, G.; KING, T. P. Expressions of recombinant venom allergen, antigen 5 of yellowjacket (*Vespula vulgaris*) and paper wasp (*Polistes annularis*), in bacteria or yeast. **Protein Express. Purif.** v. 16, p. 410–416, 1999.

NISHIOKA, S. A.; SILVEIRA, P. V. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lanceheaded viper bite in a Brazilian teaching hospital. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 47, p. 805-810, 1992.

NUNES, D. C.; FIGUEIRA, M.M.; LOPES, D. S.; DE SOUZA, D. L.; IZIDORO, L. F.; FERRO, E. A.; SOUZA, M. A.; RODRIGUES, R. S.; RODRIGUES, V. M.; YONEYAMA, K. A. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology**. v. 140(7), p. 844-854, 2013.

OKA, C.; TANAKA, M.; MURAKI, M.; HARATA, K.; SUZUKI, K.; JIGAMI, Y. Human lysozyme secretion increased by alpha-factor pro-sequence in *Pichia pastoris*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 63, p. 1977-1983. 1999.

OLIVEIRA, T. C. **Mudanças conformacionais envolvidas na ativação interfacial de fosfolipases A2 – Uma análise computacional**. 2006. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2006.

OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; MENDES, M. M.; HOMSI-BRADEBURGO, M. I.; HAMAGUCHI, A.; ALCANTARA, T. M.; CLISSA, P. B.; RODRIGUES, V. M. “Insights of Local Tissue Damage and Regeneration Induced By Bnsp-7, a Myotoxin Isolated from *Bothrops (Neuwiedii) pauloensis* Snake Venom”. **Toxicon**. v. 53, p. 560-569, 2009.

OWNBY, C. L.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLECTHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A2 proteins, **Toxicon** v. 37, p. 411–445, 1999.

PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOCHEA, J. A.; GORVEL, J. P.; MORENO, P. Bactericidal activity of Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipase A2

from *Bothrops asper* snake venom: synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. **Eur. J. Biochem.** v. 253, p. 452-461, 1998.

PEDERSEN, J. Z.; LOMONTE, B.; MASSOUD, R.; GUBENSEK, F.; GUTIERREZ, J. M.; RUFINI, S. Autocatalytic acylation of phospholipase-like myotoxins. **Biochemistry**. v. 34(14), p. 4670-4675, 1995.

PERBANDT, M.; WILSON, J. C.; ESCHENBURG, S.; MANCHEVA, I.; ALEKSIEV, B.; GENOV, N.; WILLINGMANN, P.; WEBER, W.; SINGH, T. P.; BETZEL, C. Crystal structure of vipoxin at 2.0 Å : an example of regulation of a toxic function generated by molecular evolution. **FEBS Lett.** v. 412, p. 573– 577, 1997.

QORONFLEH, M. W.; HESTERBERG, L. K. Confronting high-throughput protein refolding using high pressure and solution screens. **Protein expression and purification**. v. 55, p. 209-24, 2007.

ROBERTO, P. G.; KASHIMA, S.; SOARES, A. M.; CHIOATO, L.; FAÇA, V. M.; FULY, A. L.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O.; FRANÇA, S. C. "Cloning and Expression of an Acidic Platelet Aggregation Inhibitor Phospholipase A2 cDNA from *Bothrops Jararacussu* Venom Gland". **Protein Expression and Purification**. v. 37, p.102-108, 2004a.

ROBERTO, P. G.; KASHIMA, S.; SOARES, A. M.; CHIOATO, L.; FAÇA, V. M.; FULY, A. L.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O.; FRANÇA, S. C. Cloning and expression of an acidic platelet aggregation inhibitor phospholipase A2 cDNA from *Bothrops jararacussu* venom gland. **Protein Expr. Purif.**, 37(1), p. 102-8, 2004b.

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. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 121, p. 215–222, 1998.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L.F.; DE OLIVEIRA, R. J. Jr.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Snake Venom Phospholipases A2: A New Class of Antitumor Agents. **Protein Pept Lett.** v. 16(8), p. 894-898. 2009.

ROMANOS, M. A.; SCORER, C. A.; CLARE, J. J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast** v. 8, p. 423-488. 1992.

ROMANOS, M. A. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 6, p. 527-533. 1995.

RUFINI, S.; CESARONI, P.; DESIDERI, R. F.; GUBENSEK, F.; GUTIÉRREZ, J. M.; LULY, P.; MASSOUD, R.; MORERO, R.; PEDERSEN, J. Z. Calcium Ion Independent Membrane Leakage Induced by Phospholipaselike Myotoxins. **Biochemistry**. v. 31, p. 12424-12430, 1992.

SÁ, J. M.; CHIOATO, L.; FERREIRA, T. L.; DE OLIVEIRA, A. H.; RULLER, R.; ROSA, J. C.; GREENE, L. J.; WARD, R. J. Topology of the substrate-binding site of a Lys49-

phospholipase A2 influences Ca^{2+} -independent membrane-damaging activity. **Biochem. J.** v.382, p.191-198, 2004.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; MAMEDE, C. C.; BELETTI, M. E.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A2 isolated from Bothrops moojeni snake venom. **Toxicon.** v. 52, p. 908-917, 2008.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1761, p. 1246-1259, 2006.

SCHRODER, T.; KIVILAAKSO, E.; KINNUNEN, P. K.; LEMPINEN, M. Serum phospholipase A2 in human acute pancreatitis. **Scand. J. Gastroenterol.** v. 15, p. 633–636, 1980.

SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Interfacial Catalysis: The Mechanism of Phospholipase A2. **Science.** v. 250, p. 1541-1546, 1990.

SCOTT, D. L. Phospholipase A2: structure and catalytic properties. In: Kini, R. M. Venon Phospholipase A2 Enzymes. **John Wiley & Sons England**, Cap. 4, p. 97-128, 1997.

SETÚBAL, S. S.; PONTES, A. S.; FURTADO, J. L.; XAVIER, C. V.; SILVA, F. L.; KAYANO, A. M.; IZIDORO, L. F. M.; SOARES, A. M.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; ZULIANI, J. P. Action of Two Phospholipases A2 Purified from Bothrops alternatus Snake Venom on Macrophages. **Biochemistry.** v. 78, Nº. 2, p. 194203, 2013.

SHIMOHIGASHI, Y.; TANI, A.; MATSUMOTO, H.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI, Y. Lysine 49-phospholipases A2 from Trimeresurus flavoviridis venom are membrane-acting enzymes, **J. Biochem.** v. 118, p.1037–1044, 1995.

SILVA, V. X. The Bothrops neuwiedi complex, p. 410-422. In Campbell, J.A. & Lamar, W.W. (ed.). **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere.** Comstock, Ithaca, London. 2004.

SINGH, S. B.; ARMUGAM, A.; KINI, R. M.; KANDIAH, J. Phospholipase A2 with platelet aggregation inhibitor activity from Austrelaps superbus venom: protein purification and cDNA cloning. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 375, p. 289-303, 2000.

SINGH, G.; GOURINATH. S.; SHARMA, S.; PARAMASIVAM, M.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T. P. Sequence and crystal structure determination of a basic phospholipase A2 from common krait (Bungarus caeruleus) at 2.4 Å resolution: identification and characterization of its pharmacological sites. **J Mol Biol.** v. 307, p. 1049–1059, 2001.

SINGH, G.; JASTI, J.; SARAVANAN, K.; SHARMA, S.; KAUR, P.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T. P. Crystal structure of the complex formed between a group I phospholipase A2 and a naturally occurring fatty acid at 2.7 Å resolution. **Protein Sci.** v. 14, p. 395–400, 2005.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1488, p. 1–19, 2000.

SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. Structural and Functional Characterization of Myotoxin I, a Lys49 Phospholipase A2 Homologue from Bothrops moojeni (Caissaca) Snake Venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 373, p. 7-15, 2000a.

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. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 378, p. 201–209, 2000b.

SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Phospholipases A2 myotoxins from Bothrops snake venoms: Structure-function relationship. **Curr. Org. Chem.** v. 8, p. 1677-90, 2004a.

SOUZA, D. H.; IEMMA, M. R.; FERREIRA, L. L.; FARIA J. P.; OLIVA, M. L.; ZINGALI, R. B.; NIEWIAROWSKI, S.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v.384, p 341-350, 2000.

STÁBELI, R. G.; AMUI, S. F.; SANT'ANA, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R.; SOARES, A. M. Bothrops moojeni myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 142, p. 371–381, 2006.

STADEL, J. M.; HOYLE, K.; NACLERIO, R. M.; ROSHAK, A.; CHILTON, F. H. Characterization of phospholipase A2 from human nasal lavage. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.** v. 11, p. 108–113, 1994.

STRATTON, J.; CHIRUVOLU, V.; MEAGHER, M. High cell-density fermentation. **Methods Mol. Biol.** v. 103, p. 107-120. 1998.

TANG, L.; ZHOU, Y. C.; LIN, Z. J. Crystal structure of agkistrodotoxin, a phospholipase A2-type presynaptic neurotoxin from Agkistrodon halys pallas. **J Mol Biol.** v. 282, p. 1–11, 1998.

TAKANO, K.; TSUCHIMORI, K.; YAMAGATA, Y.; YUTANI, K. Effect of foreign N-terminal residues on the conformational stability of human lysozyme. **Eur. J. Biochem.** v. 266, p. 675-682. 1999.

TEIXEIRA, C. F. P.; LANDUCCI, E. C. T.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venoms myotoxic phospholipase A2. **Toxicon**. v. 42, p. 947-962, 2003.

TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; DA SILVA, F. M.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SILVA JR, F. P.; IZIDORO, L. F.; FULY, A. L.; JULIANO, M. A.; DOS SANTOS, C. R.; MURAKAMI, M. T.; SAMPAIO, S. V.; DA SILVA, S. L.; SOARES, A. M. Molecular characterization of an acidic phospholipase A(2) from *Bothrops pirajai* snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. **Arch. Toxicol.**, v. 85(10), p. 1219-33, 2011.

VADAS, P. Elevated plasma phospholipase A2 levels: correlation with the hemodynamic and pulmonary changes in Gram-negative septic shock. **J. Lab. Clin. Med.** v. 104, p. 873-881, 1984.

VADAS, P.; PRUZANSKI, W. Role of secretory phospholipases A2 in the pathobiology of disease. **Lab. Invest.** v. 55, p. 391-404, 1986.

VALLE, A. L.; BRITES, V. L. C. Nomes populares e aspectos ecológicos de *Bothrops pauloensis*(Amaral, 1925) em áreas antropizadas do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zootecias**. v. 10, n. 2, p. 155-161, 2008.

VEENHUIS, M.; VAN DIJKEN, J. P.; HARDER, W. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeast. **Adv. Microb. Physiol.** v. 24, p. 1-82. 1983.

VUORELA, A.; MYLLYHARJU, J.; NISSI, R.; PIHLAJANIEMI, T.; KIVIRIKKO, K. I. Assembly of human prolyl 4-hydroxylase and type III collagen in the yeast *Pichia pastoris* : formation of a stable enzyme tetramer requires coexpression with collagen and assembly of a stable collagen requires coexpression with prolyl 4-hydroxylase. **EMBO J.** v. 16, p. 6702-6712. 1997.

WANG, X. Q.; YANG, J.; GUI, L. L.; LIN, Z. J.; CHEN, Y. C.; ZHOU, Y. C. Crystal structure of an acidic phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon halys pallas* at 2.0Å resolution. **Journal of Molecular Biology**. v. 255(5), p. 669-676, 1996.

WANG, P.; ZHANG, J.; SUN, Z. Y.; CHEN, Y. H.; LIU, J. N. Glycosylation of prourokinase produced by *Pichia pastoris* impairs enzymatic activity but not secretion. **Protein Express. Purif.** v. 20, p. 179-185. 2000.

WARD, R. J.; CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H.; RULLER, R.; SÁ, J. M. Active -site mutagenesis of a Lys49- phospholipase A2: biological and membrane -disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochem J.** v. 362 (Pt 1), p. 89-96, 2002.

WHITE, C. E.; KEMPI, N. M.; KOMIVES, E. A. Expression of highly disulfide-bonded proteins in *Pichia pastoris*. **Structure**. v. 2, p. 1003-1005. 1994.

WHITE, C. E.; HUNTER, M. J.; MEININGER, D. P.; WHITE, L. R.; KOMIVES, E. A. Large-scale expression, purification and characterization of small fragments of thrombomodulin: the roles of the sixth domain and of methionine 388. **Protein Eng.** v. 8, p. 1177-1187. 1995.

XU, S.; GU, L.; WANG, Q.; SHU, Y.; SONG, S.; LIN, Z. Structure of a king cobra phospholipase A2 determined from a hemihedrally twinned crystal. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.** v. 59, p. 1574–1581, 2003.

ZOUARI-KESSENTINI, R.; LUIS, J.; KARRAY, A.; KALLECH-ZIRI, O.; SRAIRI-ABID, N.; BAZAA, A.; LORET, E.; BEZZINE, S.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N. Two purified and characterized phospholipases A2 from Cerastes cerastes venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration. **Toxicon.** v. 53(4), p. 444-53, 2009.

Capítulo 2:

**Caracterização bioquímica e funcional da rBnSP-7: Uma fosfolipase A₂ miotóxica
homóloga recombinante da peçonha de *Bothrops pauloensis***

**Caracterização bioquímica e funcional da rBnSP-7: Uma fosfolipase A₂ miotóxica
homóloga recombinante da peçonha de *Bothrops pauloensis***

Lino Fernando G. de Lima^{a,e}; Dayane L. N. de Souza^{a,e}; Daiana Silva Lopes^{a,e}; Carlos A.
H. Fernandes^b; Marcos R. M. Fontes^b; Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama^a; Renata
Santos Rodrigues^{a,e}; Veridiana M. Rodrigues^{a,e*}

^a Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia(UFU),
Uberlândia-MG, Brasil.

^b Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, Brasil.

^e Instituto Nacional de Ciencia e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (N-Biofar),
Belo Horizonte-MG, Brasil.

*Corresponding author: Prof. Dr. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila e-mail:
veridiana@ingeb.ufu.br FAX. 55 34-3218-2203.

Resumo

As fosfolipases A₂ (PLA₂s) estão entre os principais componentes de peçonhas animais capazes de promover um largo espectro de efeitos farmacológicos, tais como anticoagulação, inibição da agregação plaquetária, cardiotoxicidade, neurotoxicidade, hipotensão arterial, ação pró-inflamatória e miotoxicidade. As PLA₂s também exercem diferentes efeitos tais como ação bactericida, antiparasitária e antitumoral. O presente trabalho teve como objetivo expressar, purificar e caracterizar bioquímica e funcionalmente uma PLA₂ Lys-49, denominada BnSP7. O inserto para rBnSP-7 foi obtido previamente a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *Bothrops pauloensis*. Este foi inserido no vetor pPicZαA e utilizado para transformação e propagação em *E. coli* (linhagem DH5α) e em seguida inserido no genoma de *Pichia pastoris* linhagem KM71H. A indução da expressão ocorreu a 200 rpm, 26°C por 144 horas adicionando-se metanol 0.5% (v/v) diariamente à cultura. A caracterização bioquímica (massa molecular, pI e western blotting) da rBnSP-7 purificada em coluna Ni-NTA super *flow* confirmaram a autenticidade da proteína expressa. Além disso, a estrutura secundária da rBnSP-7 foi analisada por dicroísmo circular (CD) revelando similaridade entre os espectros de CD das proteínas recombinante e nativa. Quando avaliada funcionalmente, a rBnSP-7 foi capaz de induzir miotoxicidade no músculo gastrocnêmio de camundongos, no entanto não foi citotóxica sobre linhagens de células C2C12, tEnd e Hela. Analisados em conjunto, nossos resultados demonstraram que a metodologia empregada para a expressão da rBnSP7 foi satisfatória, no entanto experimentos adicionais devem ser realizados a fim de obter uma forma da toxina recombinante que apresente maior similaridade em termos de efeitos biológicos quando esta for comparada à toxina selvagem.

Palavras-chave: Expressão heteróloga, *P. pastoris*, BnSP-7, *Bothrops pauloensis*

Abstract

Phospholipase A₂ (PLA₂) are among main components of animal venoms able to act on a large spectrum of pharmacological effects, such as anticoagulants, platelet aggregation inhibition, cardiotoxicity, neurotoxicity, hypotension, pro-inflammatory action and myotoxicity. The PLA₂s also have different effects such as bactericide, antiparasitary and antitumor. The aim of this work was the expression, purification and biochemical and functional characterization of a Lys-49 PLA₂, named BnSP-7. The insert for rBnSP-7 was previously obtained from a cDNA library of the *Bothrops pauloensis* venom gland. This was inserted into the pPicZαA vector and used for transformation and propagation into *E. coli* (DH5α strain) and then inserted in the genome of *Pichia pastoris* KM71H. The expression was induced at 200 rpm, 26 °C for 144 hours adding methanol 0.5% (v/v) in the culture on a daily basis. The biochemical characterization (molecular weight, pI and western blotting) of purified rBnSP-7, in Ni-NTA superflow column, confirmed the authenticity of the expressed protein. Furthermore, the secondary structure of rBnSP-7 was analyzed by circular dichroism (CD) showing similarity between the CD spectrum of recombinant and native protein. When evaluated functionally, rBnSP-7 was able to induce myotoxicity in gastrocnemius muscle of mice, however there was no cytotoxic effect on C2C12, HeLa and tEnd cell lines. When analyzed in conjunction, our results demonstrated that the methodology used for the expression of rBnSP7 was satisfactory, however additional experiments should be performed in order to obtain a recombinant toxin form at higher similarity in terms of biological effects when it is compared to wild toxin.

Word Keys: Heterologous expression, *P. pastoris*, BnSP-7, *Bothrops pauloensis* venom.

1. Introdução

As fosfolipases A₂ (PLA₂, E.C. 3.1.1.4) são extensamente encontradas em diversos organismos e secreções, dentre essas as peçonhas de serpentes (HIGUCHI *et al.*, 2007; ZOUARI-KESSENTINI *et al.*, 2009; GARCIA-DENEGRI *et al.*, 2010). Estas enzimas desempenham papéis importantes no metabolismo de lipídios, tendo como principais substratos os fosfolipídeos de membrana plasmática celular. Além disso, as PLA₂s hidrolisam especialmente a ligação acil-éster na posição *sn*-2 dos glicerofosfolipídeos (ARNI & WARD, 1996; KINI., 2003), liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos, principalmente, o ácido araquidônico.

Os produtos derivados da ação de PLA₂s sobre fosfolipídeos de membrana representam precursores de moléculas de sinalização que podem exercer uma grande variedade de funções biológicas. Os lisofosfolipídeos estão associados aos processos de sinalização celular e remodelagem dos fosfolipídeos da membrana. Além disso, podem atuar como precursores de mediadores lipídicos, tais como ácido lisofosfatídico, envolvido na sobrevivência, proliferação e migração celular e o fator de ativação plaquetária, particularmente relacionado aos processos inflamatórios. O ácido araquidônico, liberado pela ação enzimática das fosfolipases A₂, também desempenha papel de precursor de lipídeos bioativos (eicosanóides), como as prostaglandinas, tromboxanas, prostaciclina e leucotrienos. Os eicosanóides detêm funções sobre uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, atuando na regulação do sono, na formação de potentes mediadores das respostas imunes e da inflamação, e na percepção da dor (SIX e DENNIS, 2000; SCHALOSKE e DENNIS, 2006).

As PLA₂s estão distribuídas em 15 grupos (I a XV) os quais estão presentes em cinco categorias de acordo com a origem, sequência de aminoácidos, mecanismos catalíticos, características funcionais e estruturais. Estes grupos incluem as PLA₂s citosólicas (cPLA₂), as PLA₂s Ca²⁺ independentes (iPLA₂), as acetil-hidrolases - fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH), as PLA₂s lisossomais e as PLA₂s secretadas (sPLA₂), grupo que inclui as PLA₂s encontradas em peçonhas de serpentes (SCHALOSKE e DENNIS, 2006; BURKE e DENNIS, 2009a).

As sPLA₂s são enzimas com massa molecular variável entre 14.000 e 18.000 Daltons, além de usualmente possuírem de 5 a 8 pontes dissulfeto. Estas enzimas

apresentam uma histidina no sítio ativo e requerem a presença do íon Ca^{2+} que, na ordem de milimolar, é um cofator essencial para a ligação do substrato no sítio catalítico e para o processo enzimático dessas proteínas. (SIX e DENNIS, 2000; BERG *et al.*, 2001; SCHALOSKE e DENNIS, 2006; BURKE e DENNIS, 2009a).

As sPLA₂ estão largamente envolvidas no envenenamento por animais peçonhentos (NISHIOKA e SILVEIRA, 1992; SOARES *et al.*, 2004; SANTOS-FILHO *et al.*, 2008), sendo que as PLA₂s do grupo IIA são predominantes em peçonhas de serpentes (FRY *et al.*, 2008). As PLA₂s do grupo IIA podem ser subdivididas em pelo menos três subclasses de acordo com o resíduo de aminoácido existente na posição 49, o que determina sua atividade catalítica, a saber: (a) PLA₂s Asp49, apresentam atividade catalítica elevada, (b) PLA₂s Ser49 com menor atividade catalítica, e (c) PLA₂s Lys49, Asn49 ou Arg49, que são enzimas cataliticamente inativas (SHIMOHIGASHI *et al.*, 1995; ARNI e WARD, 1996; OWNBY *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 2004; DE PAULA *et al.*, 2009).

A BnSP - 7 é uma importante fosfolipase A₂ Lys49 isolada a partir da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (RODRIGUES *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2000b), serpente que segundo a classificação de Silva (2004) passou a ser chamada de *Bothrops pauloensis* (VALLE e BRITES, 2008). Em 2009, de acordo com uma nova classificação passou a ser denominada *Bothropoides pauloensis* (FENWICK, 2009). E finalmente em 2012, essa serpente voltou a ser denominada *Bothrops pauloensis* (CARRASCO, 2012).

Esta enzima foi descrita como uma proteína cataliticamente inativa com massa molecular em torno de 14 kDa e estrutura semelhante a de outras miotoxinas Lys49 (MAGRO *et al.*, 2003). Esta enzima possui em sua composição de aminoácidos muitos resíduos básicos e hidrofóbicos, e resíduos de Gly30, Gly32, His48, Lys49, Asp99, bem como regiões 115-129 conservados. Esta toxina possui um ponto isoelétrico de 8,8 e pode induzir necrose em fibras musculares de ratos (RODRIGUES *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2000b.; MAGRO *et al.*, 2003), Além disso, essa proteína induz miotoxicidade, evidenciada por aumento nas taxas de creatina cinase (CK) plasmática. Também promove bloqueio da contração neuromuscular e citotoxicidade em células bacterianas, dentre outros efeitos (SOARES *et al.*, 2000b).

A obtenção de moléculas recombinantes com o auxílio de técnicas de biologia molecular, devido à alta produtividade e versatilidade desse mecanismo, facilita os

estudos que visam elucidar os possíveis mecanismos de ação destas toxinas a partir da aquisição de seus modelos moleculares e de estudos funcionais, podendo dessa forma abrir caminhos para a compreensão de quais domínios estruturais são responsáveis pelas diferentes atividades apresentadas por estas enzimas, além de reduzir o sofrimento e estresse causado às serpentes na extração da peçonha. (ROBERTO *et al.*, 2004a; CARDOSO *et al.*, 2011).

Algumas PLA₂s recombinantes foram expressas a partir de diferentes peçonhas. Chang, Wu e Chang (1996) expressaram uma PLA₂ de *Bungarus multicinctus* e demonstraram que esta era cataliticamente ativa. Da mesma forma, três isoformas recombinantes de PLA₂ da peçonha de *Naja naja sputatrix* (ARMUGAM *et al.*, 1997) e uma PLA₂ recombinante clonada e expressa em *E. coli* a partir da glândula de *Bothrops jararacussu* (ROBERTO *et al.*, 2004a e 2004b) apresentaram as mesmas características estruturais e funcionais das PLA₂s nativas. Ward *et al.* (2001) expressaram a bothropstoxina-I (BthTX-I) uma PLA₂ Lys-49 isolada da peçonha de *B. jararacussu*. A proteína recombinante demonstrou propriedades idênticas à nativa. Posteriormente, Sá *et al.* (2004) clonaram e expressaram genes mutantes da BthTX-I, demonstrando que a substituição de alguns aminoácidos podem aumentar ou diminuir a toxicidade desses compostos em algum aspecto. Além disso, pode possibilitar elucidar alguns mecanismos de ação, como demonstrado que a topologia da região de ligação ao substrato da BthTX-I tem um efeito direto sobre o dano membrana e, com isso, implica que a ligação do substrato possui um papel importante neste processo. Recentemente, Silveira *et al.* (2013) clonaram e expressaram uma fosfolipase A₂ ácida (BmoopLA₂) da peçonha de *Bothrops moojeni*, que apresenta alta atividade fosfolipásica, bem como efeito bactericida moderado e atividade citotóxica semelhante aos observados na proteína nativa.

Tais pesquisas utilizam técnicas de biologia molecular como ferramentas para buscar entender a relação estrutura-função de moléculas, gerando com isso, não somente conhecimentos em várias áreas do saber, mas também agregando conhecimentos que podem contribuir para o desenvolvimento e utilização de fármacos no tratamento de acidentes ofídicos, ou no tratamento de algumas patologias. Em função da BnSP-7 ser uma molécula alvo com potencialidade terapêutica interessante, devido as ações locais e sistêmicas que ela apresenta, o objetivo desse trabalho foi a

clonagem, expressão, purificação e caracterização estrutural e funcional parciais dessa toxina.

2. Material e métodos

2.1. Obtenção da peçonha, PLA₂ BnSP-7 nativa e anticorpos anti-BnSP-7

A peçonha de *Bothrops pauloensis* utilizada no presente trabalho para a purificação da PLA₂ BnSP-7 (nativa) utilizada como controle positivo nos ensaios de caracterização funcional foi obtida a partir de espécimes mantidas no Serpentário Proteína Bioativas LTDA, estabelecido na Fazenda Boa Esperança S/N – Zona Rural – Batatais/SP. Este serpentário possui comprovante de registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (nº de cadastro: 471301). A peçonha liofilizada foi pesada, dissolvida em salina tamponada (PBS) pH 7,2 e centrifugada a 3000 *xg* por 10 min. O sobrenadante foi coletado e imediatamente utilizado para purificação da PLA₂ BnSP-7 de acordo com a metodologia descrita por Soares *et al.* (2000b), com algumas modificações. O anticorpo anti-BnSP-7 foi obtido em nosso laboratório de acordo com a metodologia descrita por Melo, 2013.

2.2 Animais

Os camundongos machos isogênicos da linhagem BALB/c foram mantidos em condições padrão de luz (ciclo de 12h luz/12h escuro em temperatura ambiente) no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), com água e suplemento alimentar “*ad libitum*”. A utilização e as metodologias empregadas para o manuseio dos animais foram aprovadas pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA, 063/08 e 046/09) da Universidade Federal de Uberlândia e estavam de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal/ Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (COBEA/SBCAL).

2.3. Obtenção do gene da fosfolipase A2 BnSP-7 da biblioteca de cDNA de *B. pauloensis*.

O cDNA utilizado neste trabalho possui a sequência para a expressão de uma fosfolipase A₂ básica Lys49 denominada BnSP-7. O clone contendo a ORF que codifica a BnSP-7 foi isolada a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula da peçonha de *Bothrops pauloensis* no laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais da Universidade Federal de Uberlândia (RODRIGUES *et al.*, 2012). A sequência de nucleotídeos do cDNA da BnSP-7 (cluster BP018) está depositada no *GenBank* sob número de acesso GR955237 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAF66703.1> (RODRIGUES *et al.*, 2012).

2.4. Sequenciamento e análise de nucleotídeos da BnSP-7

O clones contendo a ORF que codifica a BnSP-7 obtidos da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha da serpente *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES *et al.*, 2012) foram sequenciados utilizando o *primer* BnSP7_EcoRI *foward* (5'-CGGAATTCTTTGAATTGGGGAAGATGATCC -3') desenhado a partir de partes da sequência de nucleotídeos do cDNA da BnSP7 para obtenção da sequência completa da ORF. O sequenciamento automático foi realizado no *MEGA-BACE 1000 automated DNA sequencer* (GE Healthcare), utilizando o kit *DYEnamic ET Dye Terminator* (GE Healthcare), a partir de 300ng de DNA modelo. A sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos da BnSP-7 foi avaliada quanto à identidade em relação a sequências depositadas no banco de dados internacional *GenBank* por meio do algoritmo BLAST (ALTSCHUR, *et al.*, 1997).

2.5. Clonagem e expressão da rBnSP-7

2.5.1. Construção do vetor para expressão da rBnSP-7 em *Pichia pastoris*

Para a obtenção do clone contendo a ORF da BnSP-7, foi realizado reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para amplificação a partir do vetor pDONR-BnSP-7, previamente obtido da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha da

serpente *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES *et al.*, 2012). Para a amplificação gênica, foram desenhados *primers* específicos contendo sítios de clivagem para a enzima *EcoRI* no *primer* BnSP7_ *EcoRI* *foward* (5'- CGGAATTCTTTGAATTGGGGAAGATGATCC -3') e para a enzima *Sall* no *primer reverse* (5'- GCGTCGACGCATGGATCTGCCTTCTTGC -3'). O produto de PCR correspondente à BnSP-7, foi purificado do gel de agarose utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega). Na sequência, o produto de PCR purificado e o vetor de expressão pPicZαA (Invitrogen) foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Sall* por 16h a 37°C. Em seguida a reação foi inativada e analisada em gel de agarose a 1%. Posteriormente a ligação do inserto que codifica a BnSP-7 no vetor foi realizada por meio de reação com a enzima T4 DNA ligase por 16 h a 16°C (**Figura 1**).

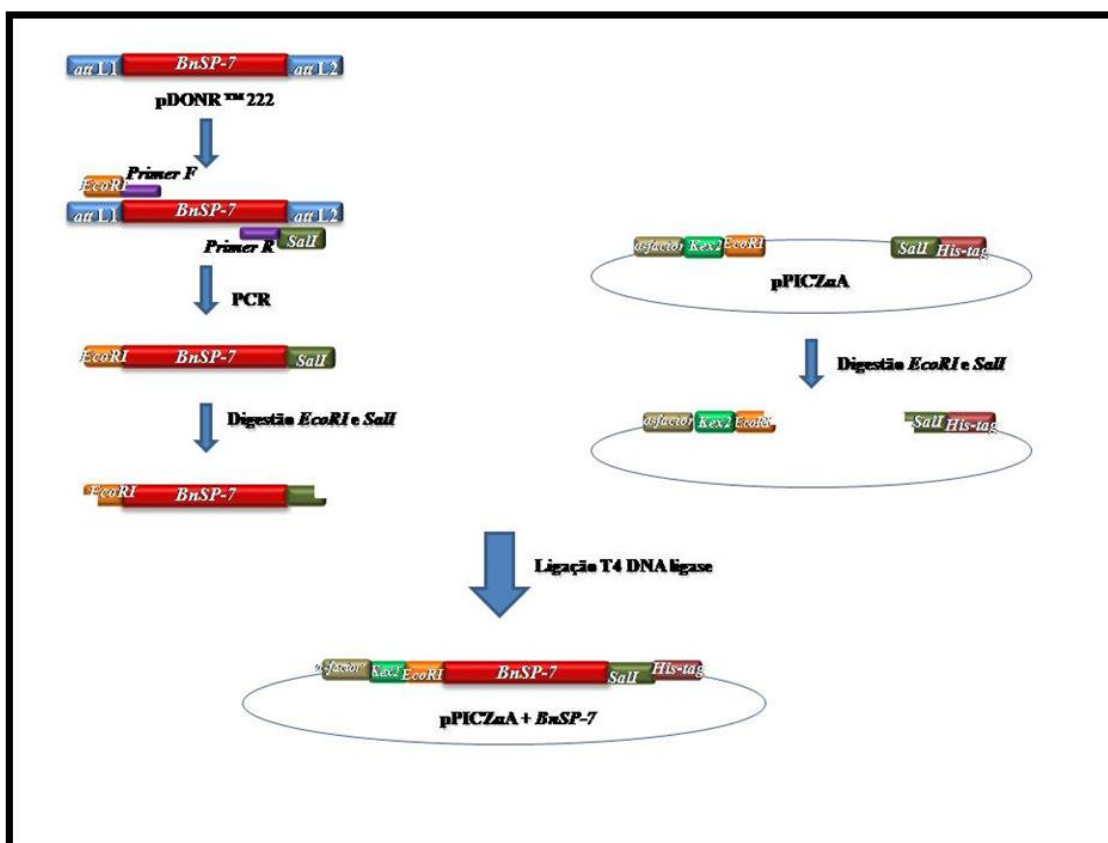


Figura 1. Construção do plasmídeo de expressão pPicZαA-BnSP7. *attL1* e *attL2* representam adaptadores. A ORF da BnSP-7 foi clonada e amplificada do vetor pDONR™ por PCR. Os *primers* utilizados contêm sítios de clivagem para as enzimas *EcoRI* e *Sall*. Os produtos de PCR e o vetor pPicZαA foram submetidos a digestão com as enzimas *EcoRI* e *Sall* para a geração de extremidades coesivas complementares. A ligação do inserto ao vetor foi realizada por meio de reação com a enzima T4 DNA ligase.

2.5.2. Preparo de bactérias (DH5α) competentes para choque térmico com CaCl₂

Para receber o vetor pPicZαA foi necessário tornar as células de *E. coli*, linhagem DH5α competentes. Esse processo foi realizado a partir de um pré-inóculo de bactérias original, ou seja, que ainda não receberam o plasmídeo em 5 mL de meio LB, a 37°C, 200 rpm por 16 horas. Desse pré-inóculo, 2 mL foram diluídos em 100mL de meio LB, nas mesmas condições do pré-inóculo até atingir a D.O. (densidade óptica) de aproximadamente 0,4. Esse meio foi centrifugado a 2450 xg durante 7 minutos e as células foram ressuspensas em 35 mL de CaCl₂ 0,1M gelado e estéril e foi deixado em repouso por 20 minutos no gelo. Após este procedimento, essa solução foi novamente centrifugada a 2450 xg por 7 minutos, sendo que foi descartado o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 8 mL de CaCl₂ 0,1M, acrescido de 2 mL de glicerol 50%. Esse material foi separado em alíquotas e mantidos a - 80°C.

2.5.3. Transformação de células de *Escherichia coli* (DH5α)

Para realizar a transformação de *E. coli* DH5α foram utilizados 100 µL de bactérias competentes e adicionados 5 µL de plasmídios recombinantes. Após esta etapa, essa solução permaneceu incubada a 42°C por 1 minuto e 20 segundos e em seguida por 3 minutos no gelo. Subsequentemente foram adicionados 800 µL de meio LB *low salt* a essa solução, que foi deixada em repouso a 37°C por 1 hora. Esse material foi plaqueado em LB *low salt* ágar, contendo 25 µg/µL do antibiótico zeocina. As placas contendo 50, 100 e 200 µL de bactérias transformadas foram preparadas e incubadas por 16 horas a 37°C.

2.5.4. PCR de colônia dos transformantes de *E. coli* DH5α

Para confirmara a presença do DNA de interesse nas colônias, utilizou-se a técnica de PCR, sendo a reação preparada em um volume final de 325 µL. Desta

solução de trabalho, 25µl foram separados em microtubos e em cada um destes foram adicionados uma colônia de bactérias transformadas. A reação continha 10pM de *primer forward* BnSP7_EcoRI e do *primer reverse* AOX3'; tampão da Taq 10x; MgCl₂ 25mM; deoxiribonucleotídeos (dNTP's) 10 mM; 1,25 U da enzima Taq polimerase e água MilliQ. A reação foi realizada em termociclador (Amplitherm) mantendo o aparelho 94°C por 3 minutos. Após isso, a reação ocorreu por 35 ciclos sob as seguintes condições: DNA molde desnaturado a 94°C por 45 segundos, hibridação com os primers 51°C por 45 segundos, extensão com taq-polimerase em presença de dNTP's, 72°C por 60 segundos. Passado os 35 ciclos, a reação foi mantida a 72°C para extensão final por 10 minutos e posteriormente a 4°C. Após o término da reação os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1%.

2.5.5. Preparação do DNA plasmidial por lise alcalina (*Miniprep*)

Das colônias positivas, algumas foram selecionadas para fazer um pré-inóculo em 10 mL de meio LB *low salt* líquido contendo 25 µg/µL de zeocina, incubados por 16 horas a 37°C e 250 rpm. Após esta etapa o material foi submetido à lise alcalina (*Miniprep*) para extração do plasmídeo, segundo Sambrook *et al.*, 2001. A cultura foi centrifugada por 5 minutos a 4°C e 3800 xg, descartando-se o sobrenadante. As células foram ressuspendidas em 600 µL da solução I contendo 50mM dextrose, 25mM Tris HCl, 10 mM EDTA gelada. A essa solução foram adicionados 10 µg de RNase 20 mg/mL e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 µL da solução II contendo 0,2M NaOH, 1% (w/v) SDS e 350 µL da solução III contendo 5M de acetato de potássio, 23% ácido acético gelada, homogeneizando e posteriormente incubando por 5 minutos. Posteriormente a cultura foi incubada por 3 minutos no gelo e centrifugada a 18000 xg por 10 minutos a 4°C. Após esta etapa, foram realizadas adições sequenciais de etanol 100% e 70% seguidos de centrifugação a 18000 xg a 4°C e deixados secar a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 20 µL de água milliQ e incubado por 30 minutos a 42°C. Após esse procedimento, o material foi quantificado em *Nanodrop* (ND-1000 spectrophotometer).

2.5.6. Linearização do plasmídeo pPicZ α A-BnSP7 com enzima de restrição PmeI

A reação de linearização do plasmídeo pPicZ α A-BnSP7 foi preparada utilizando tampão da enzima 1X, 20 U da enzima PmeI, 10 μ g do material obtido da *miniprep* e água Milli-Q, totalizando 100 μ L. A reação foi incubada a 37°C por quatro horas e analisada em gel de agarose a 1%. Posteriormente à confirmação da linearização, a enzima PmeI foi inativada a 65°C por 20 minutos.

O material linearizado foi precipitado adicionando-se acetato de sódio 3M, pH 5,2 e etanol 100% gelado. Essa solução permaneceu por 20 minutos a -80°C e posteriormente foi centrifugado a 15500 xg por 10 minutos. Em seguida, ao *pellet* foram adicionados 500 μ L de etanol 80% gelado, novamente centrifugado a 15500 xg por 10 minutos a temperatura ambiente, ressuspendido em 10 μ L de água MilliQ e quantificado em *Nanodrop* (ND-1000 spectrophotometer).

2.5.7. Preparo das células competentes de *P. pastoris*

O preparo das células *P. pastoris*, linhagem KM71H competentes foi realizado segundo protocolo descrito por Cregg, 2007. Foi realizado um pré-inóculo da célula original de *P. pastoris*, em 5 mL de meio YPD e incubado por 9 horas a 30°C e 250 rpm. Desse pré-inóculo, 50 μ L foram retirados e adicionados em erlenmeyer de 500 mL, contendo 50 mL de meio YPD. Esse material foi incubado a 30°C e 250 rpm até atingir densidade óptica (DO_{600nm}) de 1,2. Ao atingir a DO, a cultura foi centrifugada a 1500xg, 4°C por 5 minutos e ressuspendida em 10 mL de YPD acrescido de 170mM de HEPES. Posteriormente, foram adicionados a essa solução 250 μ L de ditioneitol (DTT). Esse material foi incubado a 30°C por 15 minutos sem agitação. Em seguida, foi adicionado água destilada estéril até volume final de 50 mL e centrifugado a 1500 xg, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 25 mL de água destilada estéril foram adicionados as células e repetido o passo de centrifugação. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e foram adicionados 2 mL de sorbitol 1M estéril, centrifugando as

células a 1500xg, por 5 minutos a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 µL de sorbitol 1M estéril e mantida a -20°C.

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

Em um tubo de 1,5mL foram colocados 5 µL de DNA linearizado e 40 µL de células competentes. Essa solução foi transferida para cubeta 0,2 cm (Bio-Rad) e incubadas por 5 minutos no gelo. Esse material recebeu um pulso de eletroporação nas condições de 1500V, 25 µF e 200Ω, em aparelho GenePulser II (Bio-Rad). Imediatamente após o choque, foi adicionado as células 1mL de sorbitol 1M a cubeta e transferido para um tubo de 15 mL. As células foram incubadas a 30°C por 2 horas sem agitação. Posteriormente 50, 100 e 200 µL das células foram plaqueadas em placas contendo YPDS ágar contendo 100 ou 500 µg/µL de zeocina, onde permaneceram incubadas a 30°C por 4 dias.

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

Para o PCR de colônia, a reação foi preparada utilizando o *primer forward* específico contendo sítios de clivagem para a enzima *EcoRI* (5'-CGGAATTCTTTGAATTGGGGAAGATGATCC -3') e *primer reverse* AOX-3' (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC -3'). A PCR foi realizada em volume final de 792µL. Desta solução de trabalho, 25µL foram separados em microtubos e em cada um destes foram adicionados uma colônia dos transformantes de *P. pastoris*, previamente lisados por adição de SDS 0,2%, aquecido a 90°C e centrifugado a 12000xg. A reação continha 10pM de *primer forward* BnSP7_*EcoRI* e do *primer reverse* AOX3'; tampão da Taq 10x; MgCl₂ 25mM; deoxiribonucleotídeos (dNTP's) 10 mM; 1,25 U da enzima Taq polimerase, triton X-100 a 20% e água MilliQ.

A reação foi realizada em termociclador (Amplitherm) mantendo o aparelho 94°C por 3 minutos. Após isso, a reação ocorreu por 35 ciclos sob as seguintes condições: DNA molde desnaturado a 94°C por 60 segundos, hibridação com os

primers 52°C por 90 segundos, extensão com taq-polimerase em presença de dNTP's, 72°C por 4 minutos. Passado os 35 ciclos, a reação foi mantida a 72°C para extensão final por 10 minutos e posteriormente a 4°C. Após o término da reação de PCR, os produtos foram analisados em gel de agarose a 1%.

2.5.10. Triagem em placa da expressão heteróloga em *P. pastoris*

Para avaliação das condições de expressão da proteína recombinante, as colônias que apresentaram resultado positivo para presença do inserto da fosfolipase A₂ na análise do PCR de colônia de *P. pastoris* foram selecionadas e individualmente inoculadas em placa deep well de 24 poços, contendo 3 mL de meio BMGY (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1,34% YNB, 4 x 10⁻⁵ biotina, 1% glicerol, 100 mM fosfato de potássio) por poço. Um clone contendo o plasmídio pPICZαA sem incorporação do cassete de expressão foi utilizado como controle negativo e inoculado nas mesmas condições descritas. As placas de triagem foram incubadas a 30°C sob agitação constante de 250 rpm. Após 48 h, as culturas foram centrifugadas a 1500 xg, descartando o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 2 mL de meio BMMY (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1,34% YNB, 4 x 10⁻⁵ biotina, 1% metanol, 100 mM fosfato de potássio pH 6.0), para a indução da expressão. Em seguida, as culturas foram incubadas a 26°C sob agitação constante. A indução foi mantida a partir a adição de metanol 100% em uma concentração final de 0,75% a cada 24 h. Foram coletadas alíquotas da indução nos tempos de 0h a 144 h e centrifugadas a 5000 xg por 5 minutos. Os sobrenadantes foram então analisados em gel SDS-PAGE a 12,5%, corado com nitrato de prata para determinação dos níveis de expressão.

2.5.11. Indução em larga escala

As colônias que apresentaram resultado positivo para presença do inserto da fosfolipase A₂ na análise do PCR de colônia de *P. pastoris* e níveis de expressão satisfatórios na triagem em placa foram selecionadas e individualmente inoculadas 30°C em frasco de 250 mL contendo 50 mL de meio BMGY (1% extrato de levedura, 2%

peptona, 1,34% YNB, 4×10^{-5} biotina, 1% glicerol, 100 mM fosfato de potássio pH 6.0) até que a DO_{600nm} estivesse entre 5 e 6. Atingida a DO requerida, a cultura foi centrifugada a 1500 *xg*, por 5 minutos e o *pellet* ressuspensionado em 100 mL de meio BMMY, que consiste em base (extrato de levedura e peptona); tampão fosfato de potássio 1M, pH6,0; YNB 10X; biotina 0,02 mg/ml e metanol a 0,05%. Coletou-se uma alíquota de 1mL (0h) para verificação da expressão protéica basal. A indução foi promovida pela adição de metanol 100% a cada 24 horas para uma concentração final de 0,75%. Foram coletadas alíquotas de 1 ml a cada 24 horas durante os 7 dias de indução. O restante da cultura foi centrifugado e reservado o sobrenadante. As alíquotas coletadas ao longo do processo receberam a adição do tampão da amostra (Tris HCl 1,25M pH 6.8, SDS a 10% (p/v), glicerol a 30% (v/v), azul de bromofenol a 0.1% (p/v) e β -mercaptoetanol a 15% (v/v)) e foram posteriormente analisadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% por meio de eletroforese (LAEMMLI, 1970).

2.6. Isolamento da fosfolipase rBnSP-7

2.6.1. Purificação de proteínas produzidas em *P. pastoris*

O sobrenadante obtido da indução foi filtrado em membrana de 0,45 μm (Millipore) e fracionado em resina de níquel Ni-NTA *superflow*. A afinidade dos resíduos de histidina (presentes no peptídeo de fusão C-terminal da proteína recombinante) por íons metálicos como o níquel, fez com que a proteína de interesse ficasse retida na coluna enquanto os demais contaminantes foram removidos. A coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes do tampão de lise (Tris-HCl 0,01 M; NaH_2PO_4 0,06 M e NaCl 0,01M; pH 8,0). Para remover as proteínas contaminantes e eluir a proteína recombinante de interesse, foi utilizado o tampão de eluição (Tris-HCl 0,01 M; NaH_2PO_4 0,06 M; NaCl 0,1 M; pH 8,0) contendo concentrações crescentes de imidazol (10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM). Frações de 5 ml foram coletadas manualmente e analisadas posteriormente por SDS-PAGE a 12,5%.

2.7. Caracterização bioquímica

2.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS PAGE)

A eletroforese com agente desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizada segundo a técnica descrita por Laemmli (1970). O sistema de SDS-PAGE descontínuo consistiu de: Gel de empilhamento a 3%, contendo Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) e SDS a 0,1% e gel de separação a 12,5% contendo Tris-HCl 2,0M pH 8,8 e SDS 0,1%, além de PSA 10% e TEMED, mantendo a relação de Acrilamida/Bis-Acrilamida em 0,8%:30%. Todos os géis foram preparados num sistema de eletroforese Hoefer SE 260 Mighty Small II Mini-Vertical. As amostras protéicas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625M pH 6,8; glicerol a 10%; β -mercaptoetanol 5%; 2% de SDS e 0,001% de azul de bromofenol (condição redutora). As soluções foram aquecidas a 95°C por 5 minutos em banho-maria e aplicadas em gel de eletroforese. Os padrões de massa molecular utilizados foram: Fosforilase b 97 kDa; Albumina Bovina 66 kDa; Ovoalbumina 45 kDa; Anidrase carbonica 30 kDa; Inibidor de tripsina 20,1 kDa; $\beta\alpha$ - lactoalbumina 14,4 kDa. O tampão do eletrodo continha Tris-HCl 0,025M, Glicina 0,19M e SDS 0,1%, pH 8,3. A eletroforese foi realizada em corrente de 20mA ate o indicador azul de bromofenol alcançar o final do gel. O gel foi corado por nitrato de prata, que consistiu em fixar o gel por 2 horas em metanol 50%, ácido acético 12% e formol 0,05%. Após, o gel foi lavado com etanol 50% por 3 vezes de 20 minutos cada e colocado em uma solução de pré-tratamento (tiosulfato de sódio 0,02%) por 1 minuto. Na sequência, o gel recebeu 3 enxagues de 20 segundos cada, com água destilada e impregnado com solução de AgNO_3 por 20 minutos, sendo posteriormente enxaguado 3 vezes por 20 segundos com água destilada após esse processo. O gel foi revelado com solução de Na_2CO_3 e a reação foi bloqueada com solução de metanol 50% e ácido acético 12%. O gel foi analisado posteriormente.

2.7.2. Western blotting

A fosfolipase A_2 recombinante sob condição redutora foi submetida à eletroforese SDS-PAGE 12,5% e posteriormente eletrotransferida para membrana de

nitrocelulose (Hybond™-P membrane (GE Healthcare) utilizando um sistema de eletrotransferência (Hoefer GE Healthcare). A eficiência da eletrotransferência foi avaliada pela coloração da membrana de nitrocelulose com Ponceau-S Red. A membrana foi então descorada com água e incubada com leite em pó desnatado 5% em NaCl 0,12 M e fosfato de sódio 0,04 M pH 7,2 (tampão de bloqueio), por 1h a temperatura ambiente para bloquear sítios inespecíficos. Posteriormente, a membrana foi incubada por 1h com os anticorpos anti-BnSP-7 (IgG) diluídos a 1:100 (v/v) na solução de bloqueio. Após 3 lavagens com solução de bloqueio contendo 0,05% de Tween-20, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Sigma, 1:5000 em TBS) a 37°C por 1 hora em agitação. No final da incubação a membrana foi lavada 3 vezes novamente, e revelada com DAB (3,3'-diaminobenzidina, Sigma) 0,03% em Tris-HCl 0,05M, pH 7,6, contendo 0,03% H₂O₂/OPD (o-fenilenediamina dihidrocloridato, Sigma).

2.7.3. Dosagem de Proteínas

A determinação da concentração da amostra obtida foi realizada pelo método de leitura em 562nm Micro-BCA™ Protein Assay Kit (Pierce® – Thermo Scientific). Método baseado na detecção do Cu⁺¹, produto da redução do íon Cu⁺² pela proteína. O ácido bicinonínico é o agente reconhecedor do produto reduzido.

2.8. Caracterização Bioquímica e Estrutural

2.8.1. Focalização Isoelétrica

A focalização isoeletrica da proteína recombinante foi realizada utilizando cerca de 25µg da BnSP-7 recombinante ressuspensa em 125µL de tampão de reidratação (ureia 7M, tiourea 2M, CHAPS 2% (w/v), DTT 10mM, azul de bromofenol 0.002%), contendo também tampão *IPG* 0,5% (v/v), pH 3-10 (GE Healthcare). As tiras de poliacrilamida (7 cm de comprimento) com gradiente de pH imobilizado (pH de 3 a 10) foram reidratadas no sistema *IPGbox* durante 16 horas. Posteriormente, foi realizada a focalização isoeletrica das fitas no sistema Ettan *IPGphor* 3 com o seguinte programa,

de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare): 200 V/1h, 3000 V/1h, 4000V/1h, 1250V/h e 50V por 1h.

Após a etapa descrita acima, as tiras focalizadas foram equilibradas em 10mL solução Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, ureia 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,002% (m/v) contendo 10 mg/mL de ditioneitol (DTT), durante 15 minutos. Em seguida, foi realizado um segundo equilíbrio utilizando a mesma solução adicionada 25mg/mL iodoacetamida por 15 minutos. Após o processo de equilíbrio, as tiras foram submetidas a SDS-PAGE 12.5% no sistema de eletroforese Mini VE (GE Healthcare), tal como descrito pelo fabricante, e o gel foi corado com Coomassie G-250 a 2% (w/v.)

O gel foi escaneado em scanner de imagens (GE Healthcare), usando *Image Master LabScan™* v Programa 5.0, com uma resolução de 300 dpi. A análise foi realizada por *Image Platinum 2D Mestre* v (GE Healthcare), que determinou o ponto isoeletrico e a massa molecular calculada, relacionando o logaritmo da massa molecular do padrão com a mobilidade eletroforética relativa.

2.9. Caracterização funcional

2.9.1. Estudo do efeito miotóxico em músculo gastrocnêmio de camundongos analisada por dosagem de creatina cinase plasmática

Diferentes doses (10, 25 e 50ug) da miotoxina BnSP7 nativa e recombinante diluídas em 25µL de PBS, foram injetadas no músculos gastrocnêmio direito de camundongos isogênicos da linhagem Balb/c (n=4, 18-22 g). Após intervalos de 3 horas da inoculação, os animais foram sacrificados e tiveram o sangue coletado por punção cardíaca, utilizando-se heparina como anticoagulante. Imediatamente após a coleta, o sangue foi centrifugado a 1530 xg, por 10 minutos a 4°C (Laborzentrifugem 2K 15-Sigma). Os animais controle receberam somente 25 µL de PBS. A atividade da enzima creatina cinase foi então determinada utilizando-se 20 µL de plasma pelo kit CK-NAC Cinético (Doles). O princípio deste método consiste nas seguintes reações: 1) na reação entre a creatina fosfato e a adenosina difosfato (ADP), catalisada pela enzima creatina cinase, formam-se a creatina e a adenosina trifosfato (ATP); 2) o ATP formado é utilizado para fosforilar a glicose, produzindo glicose 6-fosfato (G-6-P) na presença da

hexoquinase; 3) a seguir a G-6-P é oxidada a 6-fosfogliconato na presença de dicitinamida adenina dinucleotídeo (NAD); esta reação é catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase; 4) durante esta oxidação, a quantidade equimolar de NAD^+ é reduzido a NADH aumentando a absorbância em 340 nm. A variação em absorbância é diretamente proporcional à atividade da enzima creatina cinase. O experimento consistiu na incubação de 20 μL do plasma com 1 mL do reagente de trabalho por 2 min a 37°C. Em seguida foram realizadas três leituras em intervalos de 1 minuto a 340 nm. Para leituras superiores a 250 nm foram realizadas diluições (1/10) da amostra em questão. A média das leituras foi multiplicada pelo fator de diluição e a atividade creatina cinase foi expressa em unidades/litro (U/L), sendo que uma unidade é o resultado da fosforilação de um nanomol de creatina por minuto a 25°C.

2.9.2 Análise da citotoxicidade sobre cultura de células tEnd e Hela

As células endoteliais murinas da linhagem tEnd (Thymic endothelium) e células Hela (carcinoma do colo de útero), foram cultivadas segundo Bussolino et. al. (1991), em meio RPMI 1640 acrescido com 10% de soro fetal bovino e suplementado com 2 mM de L-glutamina, 2 mM de piruvato de sódio, 1 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, mantidas em estufa 37°C e 5% CO_2 .

Foi avaliada a ação da BnSP-7 recombinante (rBnSP-7) sobre a viabilidade celular de culturas de células tEnd e HeLa. A análise foi realizada a partir da quantificação da succinil desidrogenase, uma enzima mitocondrial presente somente em células vivas, cujo o substrato é o MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Para determinar a viabilidade e adesão celular, $1,5 \times 10^4$ células/poço foram semeadas em microplacas de cultura de 96 poços. Após a adesão, o meio foi trocado e as células foram tratadas com diferentes concentrações de rBnSP-7 (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 e 1.563 $\mu\text{g/mL}$) por um período de 24 horas. Culturas tratadas apenas com meio de cultura foram utilizadas como controle negativo. Para determinar a viabilidade celular, após 24 horas de incubação, foram adicionados diretamente sobre o meio de cultura 20 μL de uma solução contendo 5mg/mL de MTT e a cultura mantida a 37°C por 3h. Após este período, foram

adicionados 100 µL de uma solução de SDS 10%/HCl 0,01M durante um período de 18h. A intensidade da reação foi determinada pela leitura da densidade óptica a 570 nm em um leitor de ELISA (BioTeK – Elx50).

2.9.3. Análise da citotoxicidade sobre cultura de células C2C12

As células C2C12 foram cultivadas sob as mesmas condições descritas no item 2.9.2. Para a diferenciação celular, $1,5 \times 10^4$ células/poço foram inseridas em placas de 96 poços no mesmo meio de cultura. Após atingirem condições de sub-confluência, usualmente entre 24 a 48 horas, o meio de cultura foi substituído pelo meio de diferenciação, o qual consistia no mesmo meio de cultura, entretanto, suplementado com apenas 1% de soro fetal bovino. Após seis dias adicionais de cultura, observou-se uma vasta proporção de miotúbulos alongados e multinucleados. Após esse período, as culturas de células C2C12 foram tratadas com diferentes concentrações de BnSP-7 e rBnSP-7 (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 e 1.563 µg/ml) por 24 horas. Após o tratamento, as placas foram centrifugadas a 240 x g por 10 minutos a 4°C e a citotoxicidade foi avaliada pela atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada no sobrenadante das culturas celulares após a centrifugação das placas, usando o kit Cayman Chemical de acordo com as instruções do fabricante.

2.10. Dicroísmo circular (CD)

Para verificar a estrutura secundária da proteína recombinante, foram realizados experimentos de dicroísmo circular. Esta é uma técnica que permite obter dados da composição de estrutura secundária de proteínas (α -hélice e conformações β).

As medidas de CD foram realizadas em espectropolarímetro (Jasco J-815), utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,5 mm com os seguintes parâmetros: scanning speed 100 nm/min; band width 1nm; step resolution 0.5 nm e temperatura de 20°C. Cada espectro corresponde à média de 10 acumulações com o branco já devidamente subtraído. Os espectros das fosfolipases (BnsP7 nativa e recombinante) foram coletados no intervalo de 185-260nm. Todas as amostras foram analisadas na

presença de fluxo de N₂ para que O₂ presente no ar não interfira na leitura dos dados dentro do equipamento. As amostras liofilizadas foram ressuspensas, preferencialmente em água deionizada, para concentração de 300-400 µg.mL⁻¹.

Os espectros de CD foram analisados em termos de estrutura secundária utilizando o software Spectra Manager™ II. Foi utilizado também o algoritmo Continl (SREERAMA e WOODY, 2000) disponível no pacote de programas para deconvolução de curvas de CD, CDPro (SREERAMA e WOODY, 2000). A unidade utilizada para os espectros de CD foi a MRE (Mean Residue Ellipticity/ degrees cm²dmol⁻¹residue⁻¹) que é uma das mais utilizadas. As coordenadas x e y de todos os espectros apresentados foram exportados para arquivos de extensão .opj do programa Origin 8.0.

2.11. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados com desvio padrão médio. Para a determinação da significância entre as medias, Utilizou-se os testes de análise de variância (ANOVA) o e teste t, com significância de $p < 0,05$ usando os programas Prisma e Origin 8.0.

3. Resultados

3.1. Caracterização do perfil de expressão de PLA2 da biblioteca de cDNA da glândula da serpente *Bothrops pauloensis*

As sequências de PLA₂s encontradas nos transcritos da biblioteca cDNA (RODRIGUES *et al.* 2012) foram agrupadas em treze clusters (BP014 a BP026), sendo BP020 (GR955239) o mais expresso (22 clones) codificante de uma toxina similar (86%) a uma fosfolipase A₂ miotóxica (Lys-49) de *B. jararacussu* (**Tabela I**). O cluster BP018, o segundo mais expresso desta classe, apresentou 98% de identidade com a BnSP-7.

3.2. Construção do vetor de expressão pPicZαA-BnSP7

O sequenciamento do cDNA da BnSP7 recombinante demonstrou que esta codifica 162 resíduos de aminoácidos, incluindo a cauda de histidina e 154 resíduos de aminoácidos referentes a proteína. O alinhamento da sequência da proteína predita com a sequência da nativa mostrou homologia dos aminoácidos obtidos para a proteína nativa e recombinante (**Figura 2**).

O vetor de expressão na qual foi inserido o gene referente à BnSP-7 foi o pPicZαA (Invitrogen). Esse plasmídeo é característico por conter o gene *sh ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (HIGGINS e CREGG, 1998; LIN-CEREGHINO e CREGG, 2000), que confere resistência ao antibiótico zeocina, permitindo a seleção dos transformantes tanto na fase de amplificação do vetor em *E. coli*, quanto na etapa de expressão de proteínas em *P. pastoris*. Esse vetor também possui um fragmento que codifica um peptídeo sinal chamado fator α. Esse peptídeo localizado imediatamente após o promotor AOX1 permite o direcionamento da proteína recombinante através da via secretória da levedura (LAROCHE *et al.*, 1994; HIGGINS e CREGG, 1998; LIN-CEREGHINO e CREGG, 2000; CREGG *et al.*, 2000).

Tabela I. *Clusters* identificados no transcriptoma da glândula venenífera de *B. pauloensis*. Adaptado de Rodrigues *et al.* 2012.

Cluster - Fosfolipase	No ESTs	Anotation	e-value
BP014	1	emb X53471.1 VAPPLA ₂ <i>V. ammodytes</i> mRNA for phospholipase A ₂	9e ⁻²²
BP015	3	gb U0126.1 U01026 <i>Crotalus scutulatus Scutulatus</i> Mojave Toxin preproacidic Subunit.	4e ⁻¹⁸⁰
BP016	4	D0UGJ0 acidic phospholipase A ₂ <i>Bothropoides pauloensis</i>	1e ⁻¹²²
BP017	5	gb AY29391.1 <i>Bothrops</i> <i>jararacussu</i> myotoxic A ₂ like phospholipase mRNA.	1e ⁻¹²²
*BP018	16	Q9IAT9 <i>Bothrops</i> <i>neuwiedi pauloensis</i> phospholipase A ₂ homologue	0.0
BP019	13	D0UGJ0 acidic Phospholipase A2 <i>Bothropoides pauloensis</i>	0.0
BP020	22	Q9IAT9 <i>Bothrops neuwiedi</i> <i>pauloensis</i> phospholipase A ₂ homologue	
BP021	2	gb AY299391.1 <i>Bothrops</i> <i>jararacussu</i> myotoxic A ₂ like phospholipase mRNA, complete CDs	7e ⁻⁹⁴
BP022	1	gb AF490535.1 <i>Bothrops</i> <i>insularis</i> cluster BITP01A phospholipase A2 precursor, mRNA, complete CDs	1e ⁻¹⁶
BP023	2	gb AY299391.1 <i>Bothrops</i> <i>jararacussu</i> myotoxic A ₂ like phospholipase mRNA, complete cds	1e ⁻⁸⁷
BP024	1	dbj AB440236.1 <i>Trimeresurus</i> <i>flavoviridis</i> phospholipase A ₂ gene cluster (PfPLA1(psi), PfPLA2, PfPLA3(psi), PfPLA4, PfPLA5)	2e ⁻¹⁹
BP025	3	D0UGJ0 acidic phospholipase A ₂ <i>Bothropoides pauloensis</i>	7e ⁻²⁷
BP026	1	D0UGJ0 acidic phospholipase A ₂ <i>Bothropoides pauloensis</i>	5e ⁻²⁹
Total de ESTs	74		

*Cluster BP018: Fosfolipase A₂ Lys 49 (BnSP-7) de *B.n. pauloensis*

018	MRTLWIMAVLLVGVGSLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGPKDATDRCC
BnSP7	MRTLWIMAVLLVGVGSLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGQPKDATDRCC
	*****;*****
018	YVHKCCYKKLTGCDPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAI CLRENLTYN
BnSP7	YVHKCCYKKLTGCDPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAI CLRENLTYN

018	TTKKYRVYHLKPFCKKGADPC
BnSP7	TTKKYR-YHLKPFCKK-ADPC
	***** ***** *

Figura 2. Alinhamento das sequências de aminoácidos das fosfolipases A₂ nativa e sequência predita da ORF clonada da glândula de *Bothrops pauloensis*. O alinhamento foi realizado com auxílio do algoritmo MultiAlin (CORPET, 1988). As sequências estão depositadas em banco de dados do NCBI. O número 018 representa o cluster BP 018 depositada no *GenBank* sob número de acesso GR955237 (RODRIGUES *et al.*, 2012).

3.3. Clonagem do vetor pPicZαA-BnSP7 em *E. coli* DH5α competentes

Foi realizada amplificação do material genético da colônia por PCR para confirmar que todas as colônias selecionadas eram positivas, ou seja, continham o plasmídeo inserido na bactéria (**Figura 3**).

Os resultados dos seqüenciamentos mostraram que a fusão dos insertos no vetor ocorreu em fase de leitura correta (**Figura 4**).

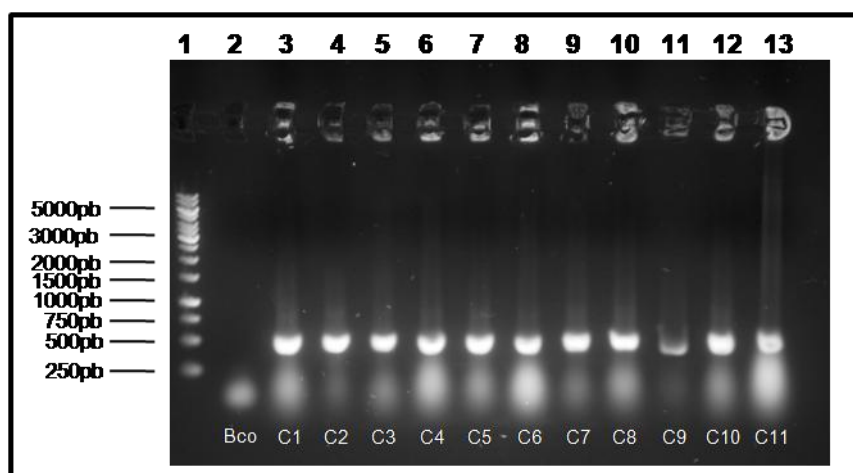


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR de colônia, corado com brometo de etídeo. 1) marcador de pares de base 1Kb (Invitrogen); 2) Controle negativo (reação sem molde); 3-13) Colônias de 1 a 11.

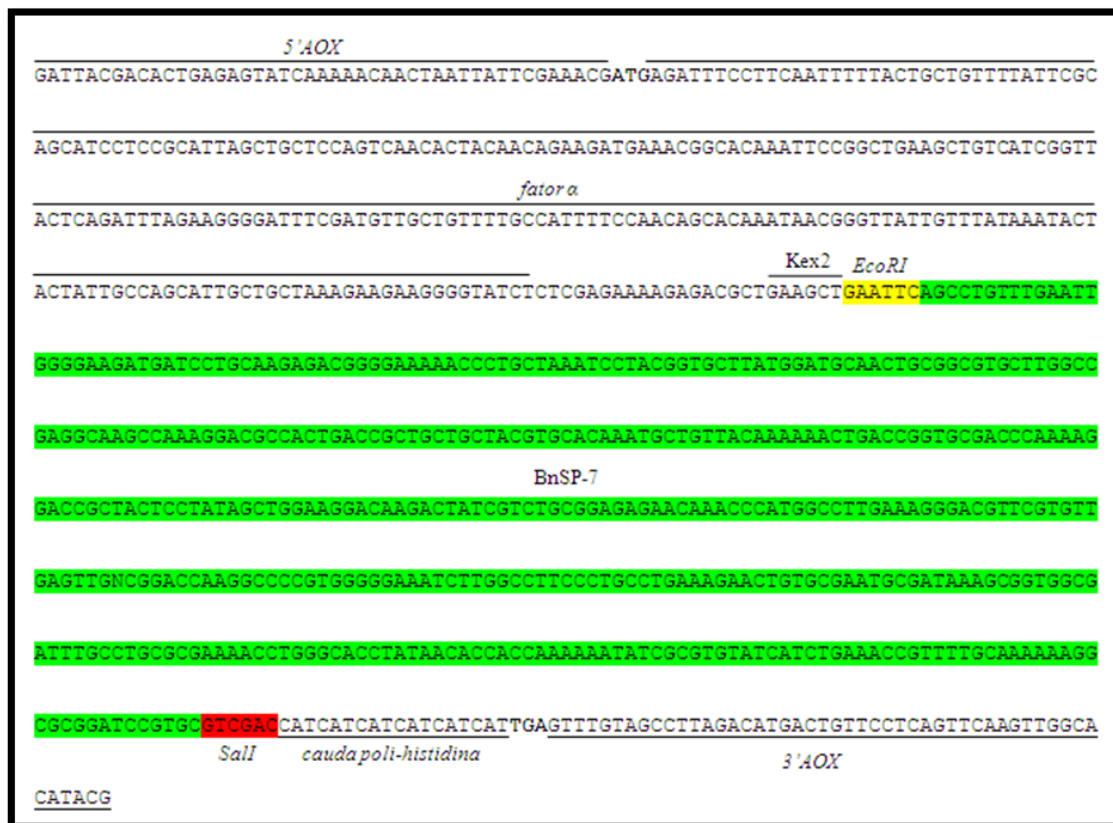


Figura 4. Sequência de nucleotídeos do plasmídeo recombinante pPicZαA-BnSP7. A ORF da BnSP-7 está inserido subjacente ao α-factor, e apresenta um sítio de restrição para EcoRI e um sítio de reconhecimento da enzima Kex2. O gene foi inserido de modo que a proteína fosse expressa com cauda de poli-histidina na porção C-terminal. Os códons que indicam o início e o fim da transcrição estão em negrito. A região que codifica a BnSP-7 está representada em verde. Os sítios de clivagem para as enzimas de restrição estão EcoRI e Sall em amarelo e vermelho, respectivamente. As regiões correspondentes ao anelamento dos *primers* estão sublinhadas.

3.4. Linearização do vetor pPicZ α A

O material obtido a partir da lise alcalina foi quantificado e posteriormente linearizado, utilizando para isso, a enzima de restrição PmeI, como mostrado na **Figura 5A**.

3.5. Transformação em *P. pastoris* KM71H

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 μ g/mL de zeocina para seleção de colônias resistentes. Estas foram submetidas a PCR para confirmação da integração do vetor ao DNA cromossomal. Foi evidenciada uma banda com cerca de 500 pb, coerente com o esperado para a sequência da proteína nativa somado aos nucleotídeos contidos nos *primers* (**Figura 5B**). Além disso notou-se bandas nas amostras de 1 a 6, exceto a amostra 3, que foram selecionadas em meio contendo 500 μ g/mL de zeocina, caracterizando possíveis transformantes multiclonais.

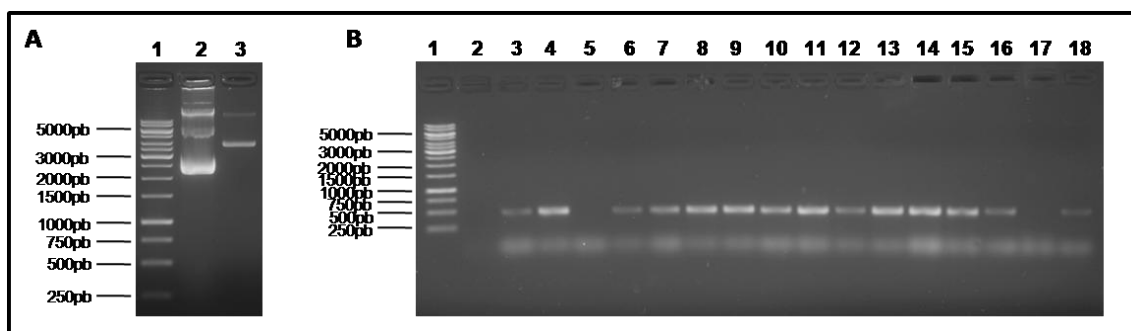


Figura 5. (A) Eletroforese dos transformantes de *P. pastoris* em gel de agarose 1% da linearização com PmeI, corado com brometo de etídeo. 1) marcador de pares de base 1Kb (Invitrogen); 2) DNA Intacto; 3) DNA Linearizado. **(B)** Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR de colônia dos transformantes de pPicZ α A-BnSP7, corado com brometo de etídeo. 1) Ladder 1Kb (Invitrogen); 2) controle negativo; 3-18) Colônias de C1 a C16.

3.6. Expressão das proteínas recombinantes

O vetor utilizado para expressão da proteína recombinante em *P. pastoris* permite a produção da proteína em fusão a seis resíduos de histidina em sua porção C-terminal. Foi realizada a expressão de 23 colônias selecionadas em placa de 24 poços. O resultado da expressão utilizou a colônia 6, a qual foi selecionada para as induções em larga escala e posterior purificação por apresentar uma alta expressão da proteína recombinante analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% (**Figura 6**).

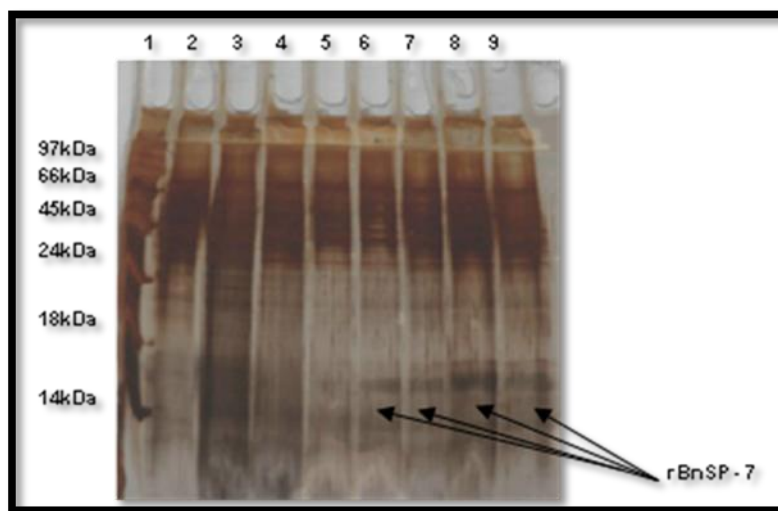


Figura 6. Gel de poliacrilamida a 12,5% corado com nitrato de prata mostrando a expressão da proteína rBnSP-7 pela colônia 6 em relação ao tempo de indução. **1)** Padrão de massa molecular; **2)** controle negativo; **3)** 0h; **4)** 24h; **5)** 48h; **6)** 72h; **7)** 96h; **8)** 120h; **9)** 144h.

3.7. Purificação da rBnSP – 7

Após a indução, a cultura foi centrifugada, o sobrenadante foi filtrado e aplicado em uma coluna de afinidade Ni-NTA *superflow* (Qiagen). Esse processo resultou em 13 frações denominadas 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A, 5B, 6A, 6B e 6C. As frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE 12,5%, o qual mostra que a aplicação do sobrenadante filtrado na resina de níquel proporcionou o isolamento da proteína recombinante, o que foi visualizado em gel de poliacrilamida a partir da fração 3B (**Figura 7**)

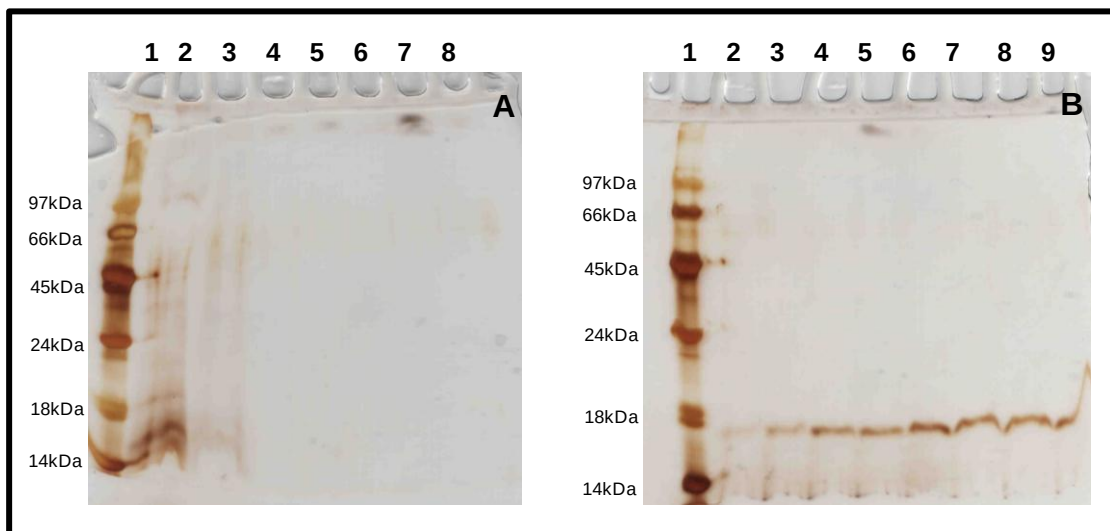


Figura 7. Gel de poliacrilamida da purificação da rBnSP-7 a 12,5% corado com nitrato de prata. **(A)** 1) Padrão de massa molecular; 2) Eluato; 3) Lavado; 4) 1A; 5) 1B; 6) 2A; 7) 2B; 8) 3A. **(B)** 1) Padrão de massa molecular; 2) 3B; 3) 4A; 4) 4B; 5) 5A; 6) 5B; 7) 6A; 8) 6B; 9) 6C.

3.8. Caracterização bioquímica

A análise eletroforética em SDS-PAGE 12,5% das frações reunidas 3B a 6C está mostrada na **Figura 8A**, na qual se observa a homogeneidade da amostra.

A expressão da proteína recombinante rBnSP -7, foi confirmada através de *western blotting*, utilizando anticorpo anti-BnSP-7 conjugado com peroxidase na diluição 1:100. (**Figura 8B**). A focalização isoeétrica da proteína rBnSP - 7 revelou uma massa molecular aparente de 16kDa para a proteína recombinante, além de um *pI* maior que o *pI* da proteína nativa (**Figura 8C**).

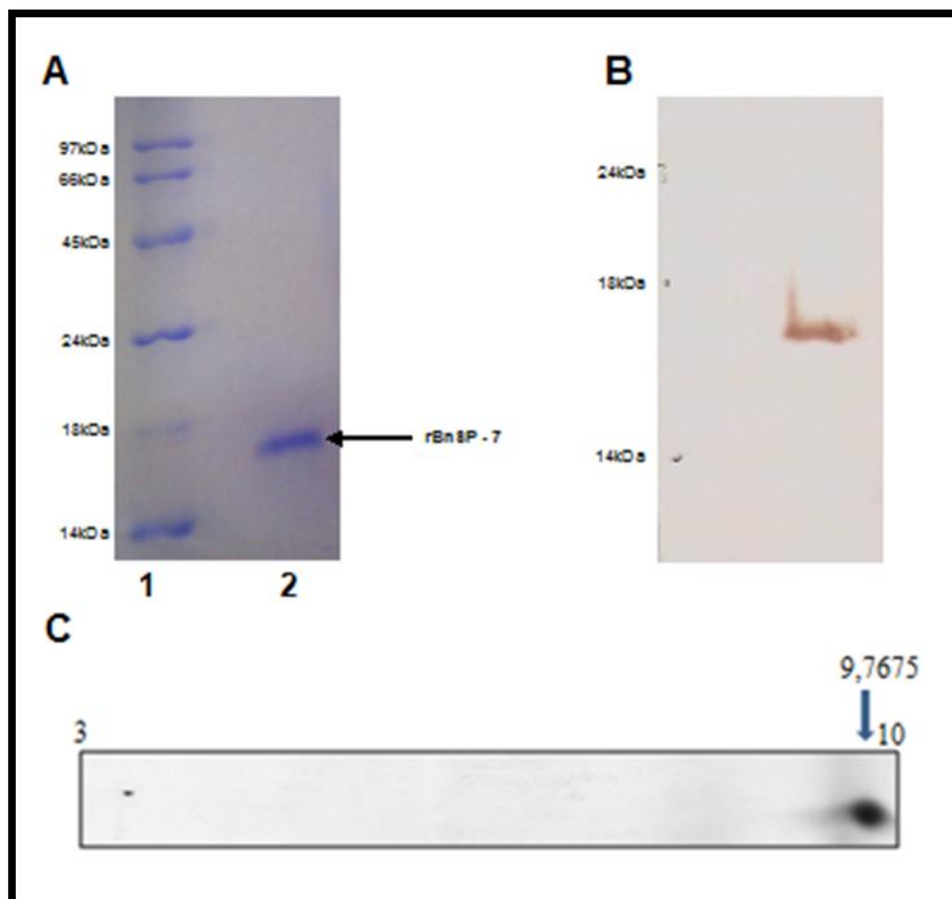


Figura 8. (A) Gel de poliacrilamida a 12,5% da rBnSP-7 purificada corado com coomassie blue R-250. **1)** Marcador de Massa Molecular; **2)** rBnSP – 7 reduzida. (B) Western blotting da proteína rBnSP-7. (C) Ensaio de focalização isoeletrica da rBnSP-7. O ensaio foi realizado numa faixa de pH de 3,0 a 10,0.

3.9. Caracterização funcional

3.9.1. Atividade miotóxica analisada por dosagem de creatina cinase no plasma

A atividade miotóxica foi determinada pela dosagem de creatina cinase (CK) no plasma sanguíneo de animais tratados com diferentes doses da rBnSP-7 determinada após 3 horas de inoculação. A rBnSP-7 na dose de 50µg e BnsP7 nativa (nas diferentes doses avaliadas) foi capaz de induzir um aumento de CK no plasma sanguíneo, quando comparado com os valores obtidos para os animais controle (Figuras 9A e B)

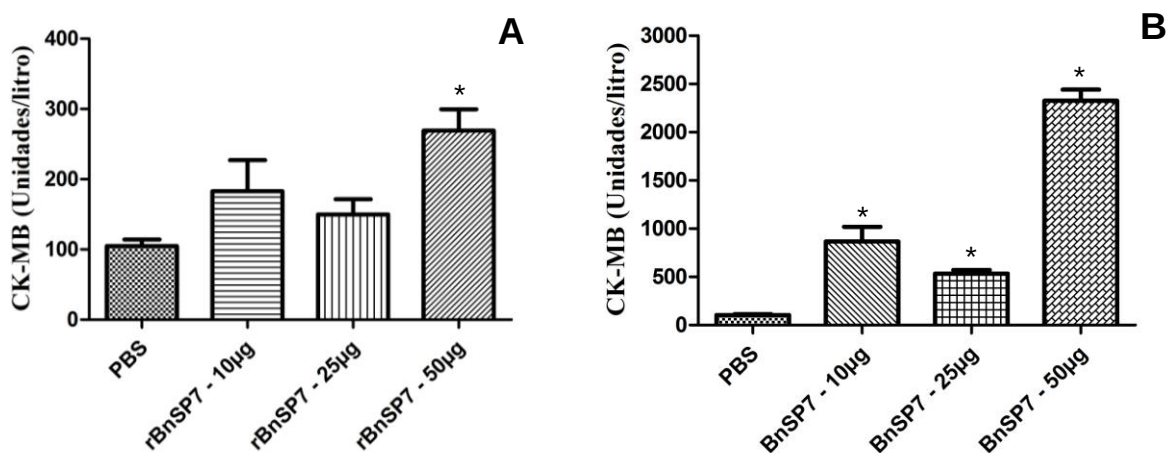


Figura 9. Inferência da atividade miotóxica por dosagem de creatina cinase plasma sanguíneo de camundongos isogênicos da linhagem Balb/c. Dosagem plasmática de CK após 3 horas de injeção de rBnSP-7 não liofilizada e filtrada em diferentes doses. **(B)** Dosagem do plasma após 3 horas de injeção de BnSP-7 nativa em diferentes doses. Dados significativos em relação ao controle (PBS) estão destacados. Os valores representam a média $\pm$ SE do experimento realizado em triplicata $n=3$.

* Diferenças estatisticamente significativa em relação ao controle PBS ($p \leq 0,05$).

3.9.2. Análise de citotoxicidade em cultura celular

O efeito da rBnSP-7 na viabilidade celular foi avaliado utilizando diferentes concentrações da proteína em células endoteliais murinas (tEnd) e HeLa por ensaio de MTT, respectivamente **(Figura 10 e 11)**. As células foram tratadas com diferentes concentrações de rBnSP-7 e BnSP-7 nativa (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 e 1.563 $\mu\text{g/mL}$) por um período de 24 horas. Como pode ser observado, a rBnSP-7 não foi capaz de causar toxicidade sobre células tEnd. Diferentemente da BnSP-7 nativa, a rBnSP-7 também não foi tóxica sobre a linhagem de célula tumoral HeLa **(Figura 11 A e B)**.

A citotoxicidade das proteínas rBnSP-7 e BnSP7 nativa sobre cultura de células C2C12 foi avaliada pela dosagem da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) após o tratamento com diferentes concentrações de BnSP-7 e rBnSP-7 por 24 horas. Como pode ser observada na **Figura 12**, a proteína recombinante não induziu citotoxicidade sobre esse tipo celular.

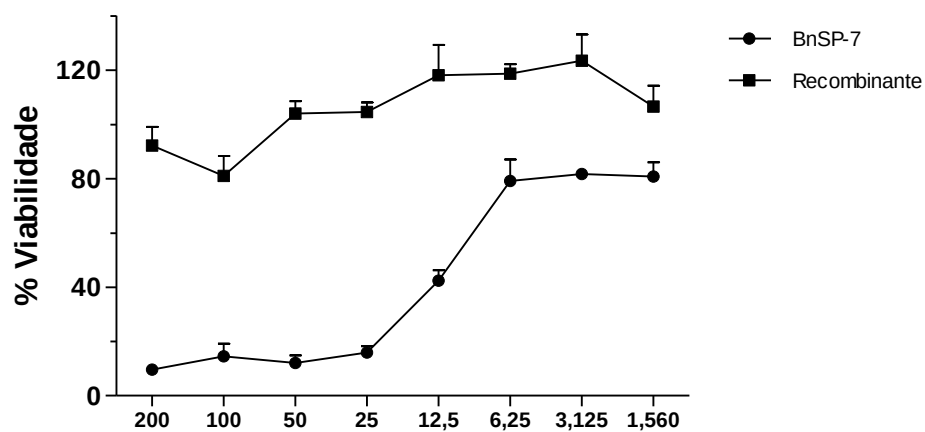


Figura 10. Porcentagem de viabilidade celular segundo o método de MTT em células tEnd tratadas com diferentes concentrações de BnSP-7 e rBnSP-7 não liofilizada e filtrada após 24h de incubação. Os valores representam a média do experimento realizado em triplicata n=3.

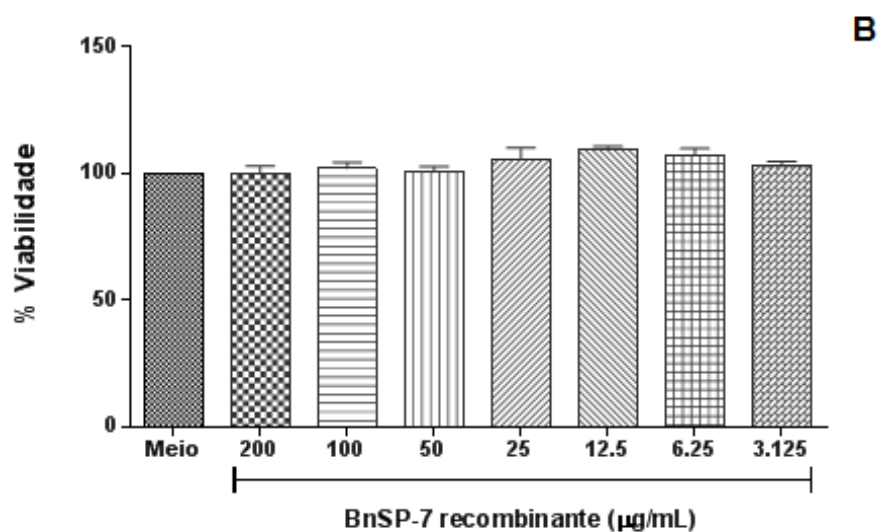
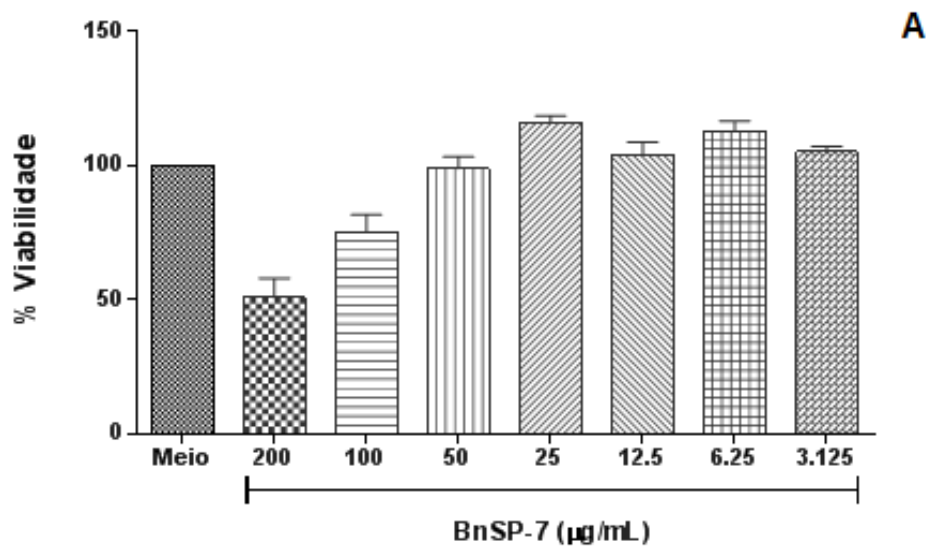


Figura 11. Porcentagem de viabilidade celular segundo o método de MTT em células HeLa tratadas com diferentes concentrações de BnSP-7 **(A)** e rBnSP-7 não liofilizada e filtrada **(B)** após 24h de incubação. Os valores representam a média do experimento realizado em triplicata n=3.

* Diferenças estatisticamente significativas em relação ao meio ($p \leq 0,05$).

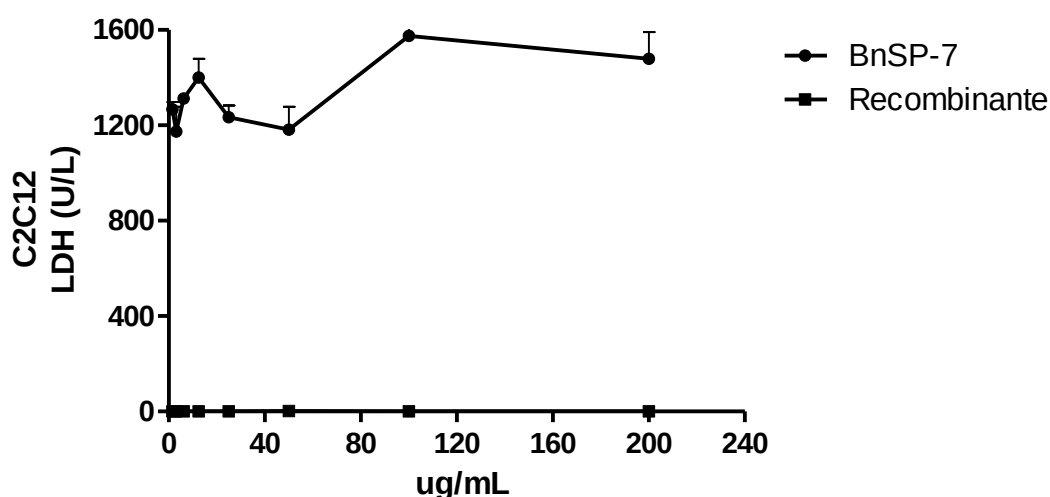


Figura 12. Avaliação da citotoxicidade direta em células C2C12, tratadas com diferentes concentrações de BnSP-7 e rBnSP-7 não liofilizada e filtrada após 24h de incubação. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores representam a média do experimento realizado em triplicata n=3.

3.10. Caracterização estrutural: Dicroísmo circular (CD)

As análises da estrutura secundária são representadas pelos espectros de dicroísmo circular da BnSP-7 nativa e recombinante. Na **Figura 13A** observa-se o espectro de CD da rBnSP-7 recombinante após processo de liofilização.

Sob essas condições, o espectro obtido foi o de uma proteína desestruturada, devido ao valor mínimo de $[\theta]$ obtido na região do 200nm, típico de elementos desestruturados *random coil*, indicando que a liofilização interfere seriamente no *folding* da rBnSP-7 recombinante. A **Figura 13B** representa a comparação dos espectros de CD da BnSP-7 nativa e da amostra de BnSP-7 recombinante.

O espectro obtido da BnSP-7 nativa caracteriza uma proteína rica em alfas hélices, por conta dos valores mínimos de $[\theta]$ obtidos a 222 nm e 208 e máximo a 191 nm, o que é condizente com as diversas estruturas cristalográficas de fosfolipases A₂ de peçonhas de serpentes. O perfil obtido da rBnSP-7 recombinante não filtrada apresentou um espectro de CD com maior semelhança ao da proteína nativa. Os valores mínimos de $[\theta]$ a 208 nm e máximo a 191 nm indicam a presença de alfas hélices.

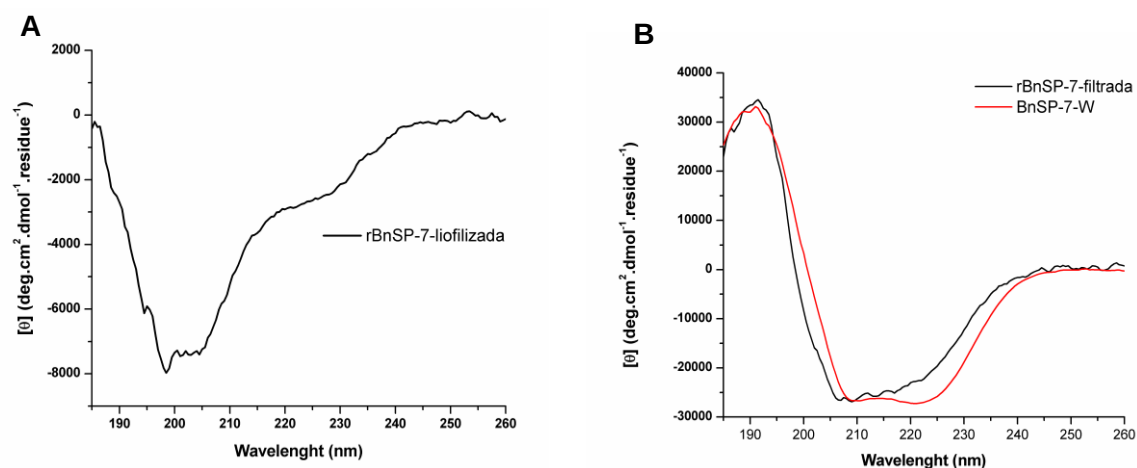


Figura 13. (A) Espectro de dicroísmo circular da BnSP-7 recombinante submetida ao processo de liofilização. As medidas de CD foram realizadas a 25°C. A concentração da proteína rBnSP-7 foi de 300 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. **(B)** Espectro de dicroísmo circular da BnSP-7 nativa (BnSP7-w) e rBnSP-7 recombinante não liofilizada. Os espectros de CD indicam semelhanças consideráveis entre os perfis. As medidas de CD foram realizadas a 25°C. A concentração da proteína BnSP-7 foi de 311 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e da proteína rBnSP-7 foi de 500 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$

4. Discussão e Conclusão

As PLA₂s se destacam por serem as proteínas bioativas mais abundantes nas peçonhas ofídicas e de outros animais (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1997). Estas são responsáveis por causarem danos locais após o envenenamento botrópico, como mionecrose e edema, além disso são responsáveis pela ação inflamatória dentre outros efeitos (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1997; SOARES *et al.*; 2000b; CHACUR *et al.*, 2003, 2004; SOARES *et al.*, 2004a). Rodrigues *et al.* (2012) demonstraram o repertório de componentes proteicos presentes na glândula de peçonha da serpente *B. pauloensis*. Dentre estes as PLA₂s mostraram ser componentes abundantes perfazendo um percentual de 26,4% do total de toxinas expressas nessa glândula.

Da peçonha de *B. pauloensis* (*B. neuwiedi pauloensis*) já foram isoladas algumas fosfolipases A₂. O isolamento da primeira PLA₂ Lys-49 (BnSP-7) a partir dessa peçonha foi descrito por Rodrigues *et al.* (1998) e posteriormente Soares *et al.* (2000b) modificaram a metodologia de isolamento dessa proteína, bem como demonstraram importantes resultados a cerca de suas características estruturais e funcionais. Em seguida, outras fosfolipases A₂ básicas Asp49 da peçonha de *B. pauloensis* foram isoladas, caracterizadas e denominadas BnpTX-I e BnpTX-II, ambas possuem atividade catalítica e edematogênica. Além disso, BnpTX-I possui elevada atividade anticoagulante, bactericida e induz um bloqueio neuromuscular em nervo frênico extraídos de camundongos (RODRIGUES *et al.*, 2004).

Rodrigues *et al.*, 2007 isolaram uma fosfolipase A₂ ácida de *B. pauloensis* (Bp-PLA₂) cuja sequência N-terminal apresentou elevada identidade com PLA₂ ácidas Asp49 já isoladas de peçonhas botrópicas. Uma outra PLA₂ ácida (BpPLA₂-TXI) dessa mesma peçonha também foi isolada e a sua sequência completa foi deduzida a partir de seu cDNA, apresentando 122 resíduos de aminoácidos os quais revelaram uma significativa similaridade com as Asp49 ácidas de outras peçonhas de serpentes. Esta enzima foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida pelo colágeno, além de induzir edema e efeito miotóxico (FERREIRA, 2011).

A investigação dos clusters (BP014 a BP026) presentes no transcriptoma da glândula venenífira de *B. pauloensis* (RODRIGUES *et al.*, 2012) revelaram um predomínio de PLA₂ Asp49 em relação às Lys49, com regiões conservadas como His48,

Asp49, Tyr52 e Asp99, sendo estes os resíduos importantes no sítio catalítico. Foram identificados também os resíduos que compreendem o “loop” ligante de cálcio, Tyr28, Gly30 e Gly32. O cluster BP018, o segundo mais expresso desta classe, apresentou 98% de identidade com a BnSP-7 (**Tabela I**). Este apresentou elevada similaridade com miotoxinas Lys-49 de outras peçonhas botrópicas sugerindo que esta PLA₂ possa desempenhar papel fundamental no envenenamento causado por *B. pauloensis*.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo clonar e expressar a rBnsP-7 uma fosfolipase A₂ recombinante da peçonha de *Bothrops pauloensis* e caracterizar parcialmente suas propriedades bioquímicas e funcionais. A ORF da BnSP-7 foi obtido da biblioteca de cDNA a partir da extração do RNA total da glândula de peçonha da serpente *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES *et al.*, 2012). O sequenciamento do cDNA de interesse e o alinhamento com sequências depositadas em bancos de dados indicaram homologia com a sequência da proteína nativa. A amplificação da ORF originou uma banda com cerca de 500 pb esperados para a região codificante de fosfolipases A₂ de peçonhas ofídicas somados aos nucleotídeos contidos nos *primers*, baseado na sequência da proteína nativa. (**Figura 4A**).

O sistema de expressão em *P. pastoris* oferece vantagens significativas para proteínas alvo que contêm múltiplas ligações dissulfeto, além de permitir a segregação da proteína autêntica na forma solúvel, sendo capaz assim, de produzir grandes quantidades da proteína recombinante em relação a sistemas bacterianos, onde comumente os produtos protéicos expressos podem se apresentar insolúveis, não enovelados ou sem o enovelamento condizente com a proteína nativa e ainda em corpos de inclusão, sendo necessários passos adicionais para solubilização e reenovelamento (MARSTON, 1986; MAKRIDES, 1996).

O plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar células da linhagem KM71H de *P. pastoris* através do método de eletroporação. A produção da proteína heteróloga foi eficiente (**Figura 5**), sendo que o rendimento máximo da proteína por litro de cultura de levedura foi estimado em 7,0 mg, sendo este um valor considerado elevado quando comparado com trabalhos em sistemas bacterianos de expressão (SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2000; RAMOS, 2001). A rBnSP-7 foi reconhecida pelo anticorpo policlonal produzido a partir da BnSP-7 nativa, isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* (**Figura 7B**).

A focalização isoelétrica da proteína recombinante (**Figura 8**) revelou um pI de 9,77, ligeiramente mais básico quando comparado pI da proteína nativa (SOARES *et al*, 2000b). Possivelmente essa diferença seja devido a presença da cauda de poli-histidina (His-Tag) composta por 6 resíduos de histidina na porção C-terminal da proteína recombinante, visto que a histidina é um aminoácido básico, pois possui um grupo imidazol básico-fraco e ainda um grupo amino.

Em relação às análises por dicroísmo circular, o espectro obtido da rBnSP-7 recombinante mostrado na **Figura 13B** só foi possível após filtração em filtro 0,22 μ m. Primeiramente, a amostra contendo a proteína recombinante não liofilizada estava diluída em água e esta apresentou um espectro de uma proteína rica em folhas beta (dados não mostrados), com o valor mínimo de $[\theta]$ obtido a 225 nm, máximo a 195 nm e do fraco sinal obtido em todo o espectro, mesmo numa alta concentração de proteína (pequeno $[\theta]$). Há ocorrências na literatura da formação de 5 folhas beta na estrutura da proteína (KELLY e PRICE, 2000) quando se obtém um valor mínimo de $[\theta]$ nesse comprimento de onda, o que não é condizente com o *folding* típico de fosfolipases A₂ de peçonhas de serpentes. Assim, ficou evidenciado nessas condições a formação de aglomerados protéicos e turvação da amostra. Após a filtração, provavelmente esses agregados ficaram retidos no filtro e então foi possível visualizar o espectro apresentado. Ficou claro que a diluição em água não representa o ambiente adequado, onde a proteína recombinante apresenta maior estabilidade. Por conta disso, após teste de solubilidade com diversos tampões, verificou-se que o tampão fosfato de sódio pH 6,0 é o que representa o melhor “ambiente” para a solubilização da proteína recombinante.

Devido ao espectro de dicroísmo circular da proteína recombinante apresentar-se semelhante ao da proteína nativa, esperava-se ação miotóxica, por aumento nas taxas de creatina cinase (CK) plasmática, bem como desestabilização de membranas, afetando a viabilidade de tipos celulares, assim como observado na proteína nativa (RODRIGUES *et al*, 1998; SOARES *et al*, 2000b; MAGRO *et al.*, 2003). Contudo, a rBnSP-7 apresentou atividade miotóxica residual quando comparada a proteína nativa. Essa análise foi realizada pela dosagem de creatina cinase no plasma de camundongos após 3 horas de injeção da toxina no músculo gastrocnêmio. Além disso, a rBnSP-7 não foi capaz de diminuir a viabilidade e adesão celular em células tEnd, HeLa e a

citotoxicidade direta pela atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada no sobrenadante das culturas de C2C12.

A presença de His-Tag na porção C-terminal da proteína recombinante pode ter sido um fator preponderante nesses resultados, visto que a porção C-terminal nessa classe de enzimas é essencial para a atividade miotóxica (LOMONTE *et al.*, 1999; CHIOATO *et al.*, 2002; LOMONTE *et al.*, 2003a; 2003b; CHIOATO *et al.*, 2007), bem como na interação com membranas de lipossomos (RUFINI *et al.*, 1992; PEDERSEN *et al.*, 1995; DE OLIVEIRA *et al.*, 2001; WARD *et al.*, 2002).

Outra hipótese que pode explicar a baixa atividade da proteína recombinante se deve ao fato de que algumas proteínas secretadas em *P. pastoris* podem receber muito mais carboidratos onde é requerida glicosilação ou ainda receber esses carboidratos em regiões onde esse processo não é necessário, que são as glicosilações inespecíficas. Os dois casos caracterizam um padrão de hiperglicosilação (CREGG *et al.*, 2000). Esse padrão é corroborado por Boldrini-França (2013), que ao expressar em *P. pastoris* uma serinoprotease presente na biblioteca de *Crotalus durissus collilineatus* (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2009), evidenciou uma maior atividade da enzima recombinante quando comparada com a proteína nativa. Essas proteases são geralmente glicoproteínas e apresentam conteúdos variáveis de N e O-glicosilações, sendo que há evidências de que essas glicosilações conferem estabilidade às serinoproteases e, em alguns casos podem influenciar o reconhecimento de substratos e acessibilidade ao sítio ativo. Entretanto, esse padrão de hiperglicosilação em PLA₂-Lys49 não confere vantagens na atividade da proteína, mas possivelmente pode estar interferindo na atividade por não fazer parte da conformação original desse composto. Também é possível que o sistema de expressão utilizado não tenha realizado pareamento dos resíduos de cisteína da fosfolipase A₂ em questão de modo correto, formando pontes dissulfeto em locais diferentes do encontrado na proteína nativa, comprometendo assim sua atividade.

Futuramente serão testados outros sistemas de expressão, que efetivamente possua uma forma recombinante que seja representativa da toxina nativa, capacitando-a a exercer as funções miotóxicas e os efeitos relacionados à desestabilização de membranas, como ruptura de lipossomos e atividades citotóxicas (citolítica ou apoptose) presentes na proteína nativa. Somente assim será possível

determinar com exatidão o papel biológico desta proteína recombinante, assim como usufruir de uma futura e possível utilização terapêutica desse composto ou de derivados.

5. Referências bibliográficas

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v. 1;25(17), p. 3389-3402, 1997.

ARMUGAM, A.; EARNEST, L.; CHUNG, M. C.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; TAN, C. H.; TAN, N. H.; JEYASEELAN, K. Cloning and characterization of cDNAs encoding three isoforms of phospholipase A2 in Malayan spitting cobra (*Naja naja sputatrix*) venom. **Toxicon.** v. 35(1), p. 27-37, 1997.

ARNI, R. H.; WARD, R. J. Phospholipase A2. A structural review. **Toxicon.** v. 34, p. 827–841, 1996.

BERG, O. G.; GELB, M. H.; TSAI, M. D.; JAIN, M. K. Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A(2)-paradigm. **Chem Rev.** v. 101, p. 2613–2654, 2001.

BOLDRINI-FRANÇA, J. **Expressão e caracterização de uma protease de interesse biotecnológico clonada da glândula de peçonha de *crotalus durissus collilineatus*.** Tese de Doutorado pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 142p. 2013.

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

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 biochemistry. **Cardiovasc. Drugs Ther.** v. 23, p. 49–59, 2009a.

BUSSOLINO, F.; DE ROSSI, M.; SICA, A.; *et al.* Murine endothelioma cell lines transformed by polyoma middle T oncogene as target for and producers of cytokines. **J Immunol.** v. 147, p. 2122–2129, 1991.

CARDOSO, K. C.; DA SILVA, M. J.; COSTA, G. G.; TORRES, T. T.; DEL BEM, L. E.; VIDAL, R. O.; MENOSSI, M.; HYSLOP, S. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics,** v. 11, p. 605, 2011.

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

CHACUR, M.; LONGO, I.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B.; GUERRA, J. L.; TEIXEIRA, C. F.; CURY, Y. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A2 from Bothrops asper snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. **Toxicon**. v. 41(6), p. 667-678, 2003.

CHACUR, M.; MILLIGAN, E. D.; SLOAN, E. M.; WIESELER-FRANK, J.; BARRIENTOS, R. M.; MARTIN, D.; POOLE, S.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; MAIER, S. F.; CURY, Y.; WATKINS, L. R. Snake venom phospholipase A2s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. **Pain**. v. 108(1-2), p. 180 -191, 2004.

CHANG, L. S.; WU, P. F.; CHANG, C. C. Expression of Taiwan banded krait phospholipase A2 in Escherichia coli, a fully active enzyme generated by hydrolyzing with aminopeptidase. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 23;225(3), p. 990-996, 1996.

CHIOATO, L.; ARAGÃO, E.A.; FERREIRA, T.L.; MEDEIROS, A.I.; FACCIOLI, L.H.; WARD, R.J. Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A2 by scanning alanine mutagenesis. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1768, p.1247-1257, 2007.

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. **Biochem. J.**, v.366, p. 971-976, 2002.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Res**. v. 16(22), p. 10881-90. 1988.

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

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant protein expression in Pichia pastoris. **Mol Biotechnol**. v. 16, p. 23–52, 2000.

DE OLIVEIRA, A. H.; GIGLIO, J. R.; ANDRILAO-ESCARSO, S. H.; ITO, A. S; WARD, R. J. A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A2 abolishes Ca²⁺ independent membrane damaging activity. **Biochemistry**. v. 40(23), p. 6912-6920, 2001.

DE PAULA, R. C.; CASTRO, H. C.; RODRIGUES, C. R.; MELO, P. A.; FULY, A. L. Structural and pharmacological features of phospholipases A2 from snake venoms. **Protein Pept Lett**. v. 16, p. 899-907, 2009.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET JR., 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**. v. 156, p. 617-640, 2009.

FERREIRA, F. B. **Caracterização bioquímico-farmacológica de uma PLA₂ ácida da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*)**. Dissertação de mestrado elaborada no Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, 2011.

FRY, B. G.; SCHEIB, H.; VAN DER WEERD, L.; YOUNG, B.; MCNAUGHTAN, J.; RAMJAN, S. F. R.; VIDAL, N.; POELMANN, R. E.; NORMAN, J. A. Evolution of an arsenal. Structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). **Mol. Cel. Proteomics**. v. 7, p. 215–246, 2008.

GARCIA-DENEGRI, M. E.; ACOSTA, O. C.; HUANCAHUIRE-VEJA, S.; MARTINS-DESOUZA, D.; MARANGONI, S.; MARUÑAK, S. L.; TEIBLER, G. P.; LEIVA, L. C.; PONCE-SOTO, L. A. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA(2) BaSpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. **Toxicon**. v. 56(1), p. 64-74, 2010.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipases A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms, in: *Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. **John Wiley and Sons**. pp. 321-352, 1997.

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

HIGUCHI, D. A.; BARBOSA, C. M. V.; BINCOLETTTO, C.; CHAGAS, J. R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; PESQUERO, J. L. Purification and partial characterization of two phospholipase A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochemie**. v. 89, p. 319-328, 2007.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. **Current Protein and Peptide Science** v. 1, p. 349-384. 2000.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**. v. 42, p. 827-840, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227(5259), p. 680-685, 1970.

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

LIN-CEREGHINO, J.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Rev**. v. 24(1), p. 45-66. 2000.

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. **Toxicon**, v.42, p.885-901, 2003b.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SANTAMARIA C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115–129 in Lys49 myotoxic phospholipases A2 from snake venoms. **Toxicon**, v.42, p.307-312, 2003a.

LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; ÂNGULO, Y.; GORVEL, J.P.; MORENO, E. Expression of myotoxicity and enhanced membrane-damaging activity by Tyr Trp-substituted peptide 115-129 of myotoxin II, a Lys49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1461, p.19-26, 1999.

MAGRO, A. J.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M. Crystal structures of BnPS-7 and BnSP-6, two Lys-49-phospholipases A2: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 311, p. 713–720, 2003.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiological reviews**. v. 60, p. 512-538, 1996.

MARSTON, F. A. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. **Biochem. J.** v. 240, p. 1-12. 1986.

MELO, L. L. **Análise da neutralização e da reatividade cruzada entre diferentes peçonhas por anticorpos policlonais anti BnSP7, uma fosfolipase A₂ purificada da peçonha de *Bothrops pauloensis*.** Monografia elaborada no Instituto de Biologia (INBIO) da Universidade Federal de Uberlândia, 2013.

NISHIOKA, S. A.; SILVEIRA, P. V. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lanceheaded viper bite in a Brazilian teaching hospital. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 47, p. 805-810, 1992.

OWNBY, C. L.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLECTHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A2 proteins, **Toxicon** v. 37, p. 411–445, 1999.

PEDERSEN, J. Z.; LOMONTE, B.; MASSOUD, R.; GUBENSEK, F.; GUTIERREZ, J. M.; RUFINI, S. Autocatalytic acylation of phospholipase-like myotoxins. **Biochemistry**. v. 34(14), p. 4670-4675, 1995.

RAMOS, O. H. P. Produção de uma pró-metaloproteinase recombinante em bactéria, ativação in vitro e modelagem molecular. **Dissertação de mestrado (Universidade Federal de São Carlos)**, 118 p. 2001.

ROBERTO, P. G.; KASHIMA, S.; SOARES, A. M.; CHIOATO, L.; FAÇA, V. M.; FULY, A. L.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O.; FRANÇA, S. C. "Cloning and Expression of an Acidic

Platelet Aggregation Inhibitor Phospholipase A2 cDNA from Bothrops Jararacussu Venom Gland". **Protein Expression and Purification**. v. 37, p.102-108, 2004a.

ROBERTO, P. G.; KASHIMA, S.; SOARES, A. M.; CHIOATO, L.; FAÇA, V. M.; FULY, A. L.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O.; FRANÇA, S. C. Cloning and expression of an acidic platelet aggregation inhibitor phospholipase A2 cDNA from *Bothrops jararacussu* venom gland. **Protein Expr. Purif.**, 37(1), p. 102-8, 2004b.

RODRIGUES, R. S.; BOLDRINI-FRANCA, J.; FONSECA, F.; DE LA TORRE, P.; HENRIQUESILVA, F.; SANZ, L.; CALVETE, J. C.; RODRIGUES, V. M. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**. v. 75, p. 2707-2720, 2012.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F.; TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A(2) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**. v. 50(1), p. 153-65. 2007.

RODRIGUES, V. M., HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; MARCUSSI, S.; ARAÚJO, A. L.; MALTA-NETO, N. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**. v. 44, p. 305-314, 2004.

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. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 121, p. 215-222, 1998.

RUFINI, S.; CESARONI, P.; DESIDERI, R. F.; GUBENSEK, F.; GUTIÉRREZ, J. M.; LULY, P.; MAASSOUD, R.; MORERO, R.; PEDERSEN, J. Z. Calcium Ion Independent Membrane Leakage Induced by Phospholipase-like Myotoxins. **Biochemistry**. v. 31, p. 12424-12430, 1992.

SÁ, J. M.; CHIOATO, L.; FERREIRA, T. L.; DE OLIVEIRA, A. H.; 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. **Biochem. J.** v.382, p.191-198, 2004.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; MAMEDE, C. C.; BELETTI, M. E.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A2 isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**. v. 52, p. 908-917, 2008.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1761, p. 1246-1259, 2006.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S., DE SOUZA, E. L., BELTRAMINI, L. M., OWNBY, C. L.; SOUZA, D. H. Expression, refolding and activity of a recombinant nonhemorrhagic snake venom metalloprotease. **Protein Express. Purif.** v. 19 (1), p. 41-47. 2000.

SHIMOHIGASHI, Y.; TANI, A.; MATSUMOTO, H.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI, Y. Lysine 49-phospholipases A₂ from *Trimeresurus flavoviridis* venom are membrane-acting enzymes, **J. Biochem.** v. 118, p.1037–1044, 1995.

SILVA, V. X. The *Bothrops neuwiedi* complex, p. 410-422. In Campbell, J.A. & Lamar, W.W. (ed.). **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Comstock, Ithaca, London. 2004.

SILVEIRA, L. B.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; SILVA, F. P. Jr.; MARCUSSI, S.; FULY, A. L.; NOMIZO, A.; DA SILVA, S. L.; STÁBELI, R. G.; ARANTES, E. C.; SOARES, A. M. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni* snake venom. **J Pharm Biomed Anal.** v.73, p. 35– 43. 2013.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1488, p. 1–19, 2000.

SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Phospholipases A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: Structure-function relationship. **Curr. Org. Chem.** v. 8, p. 1677-90, 2004.

SOARES, A. M.; GUERR-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. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 378, p. 201–209, 2000b.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. **Analytical Biochemistry** v. 287, p. 252-260, 2000.

VALLE, A. L.; BRITES, V. L. C. Nomes populares e aspectos ecológicos de *Bothrops pauloensis*(Amaral, 1925) em áreas antropizadas do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zootecias.** v. 10, n. 2, p. 155-161, 2008.

WARD, R. J., DE OLIVEIRA, A. H.; 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 Expr Purif.** v. 21(1), p. 134– 140. 2001.

WARD, R. J.; CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H.; RULLER, R.; SÁ, J. M. Active -site mutagenesis of a Lys49- phospholipase A2: biological and membrane -disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochem J.** v. 362 (Pt 1), p. 89-96, 2002.

ZOUARI-KESSENTINI, R.; LUIS, J.; KARRAY, A.; KALLECH-ZIRI, O.; SRAIRI-ABID, N.; BAZAA, A.; LORET, E.; BEZZINE, S.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N. Two purified and characterized phospholipases A2 from Cerastes cerastes venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration. **Toxicon.** v. 53(4), p. 444-53, 2009.