UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Produção e atividade antiviral das isoformas da fosfolipase A₂
crotoxina B recombinante**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Raquel Rinaldi Russo

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo

Aquino Quintana

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 10/10/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2017

RESUMO

RUSSO, R. R. Produção e atividade antiviral das isoformas da fosfolipase A₂ crotoxina B recombinante. 2017. 91f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O vírus da dengue (DENV) e o vírus da febre amarela (YFV) (gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*) representam importantes arbovírus causadores de doenças em humanos que afetam as regiões tropicais e sub-tropicais do planeta, somando milhões de infectados anualmente. Embora exista uma vacina contra o YFV, ainda são notificados muitos casos de febre amarela nas regiões endêmicas das Américas e, principalmente, da África. Recentemente, foi licenciada uma vacina contra o DENV, mas seu uso ainda é bastante restrito. Não existem agentes terapêuticos para tratamento da infecção contra nenhum desses vírus. Portanto, estudos para identificação de fármacos para combaterem a infecção pelos DENV e YFV são de suma importância. Nosso grupo descreveu a ação antiviral da fosfolipase A₂ crotoxina B (PLA₂-CB) da serpente *Crotalus durissus terrificus*, a qual tem ação diretamente sobre o envelope de DENV e YFV. A meta principal deste trabalho foi a produção das duas isoformas da PLA₂-CB (CB1 e CB2) recombinantes e avaliação de suas atividades antivirais, a fim de contribuir com a prospecção de novas drogas antivirais. Para alcançar tais propósitos, as sequências codificadoras das isoformas foram otimizadas para expressão em sistema procarioto, quimicamente sintetizadas e enzimaticamente inseridas no vetor de expressão pGS-21a. Os plasmídeos gerados foram utilizados para transformar células *E. coli* das cepas BL21(DE3), Origami B(DE3) e ArcticExpress (DE3). As proteínas recombinantes foram expressas juntamente com uma cauda de polihistidina (6xHis) no extremo C-terminal (CB1+6xHis_opt e CB2+6xHis_opt). Ambas as proteínas foram reconhecidas por anticorpos produzidos contra a PLA₂-CB *in natura* em ensaio de *Western Blot*. Considerando que as proteínas foram expressas de forma insolúvel, a purificação foi realizada em sistema de cromatografia líquida (FPLC), utilizando coluna com resina de afinidade por níquel sob condições desnaturantes, utilizando ureia como agente solubilizador. As proteínas foram renaturadas na própria coluna de níquel (*on-column*) durante a purificação, utilizando um gradiente decrescente de ureia (6-0M - 120ml - 0,1ml/min) e o detergente CHAPS como agente estabilizador. As proteínas CB1+6xHis_opt e CB2+6xHis_opt em ensaio colorimétrico de hidrólise de fosfatidilcolina apresentaram atividade fosfolipásica, indicando preservação do sítio catalítico. Em ensaio virucida contra o DENV-2, YFV e outros dois vírus envelopados: Vírus Chikungunya (CHIKV) e vírus Zika (ZIKV), as proteínas recombinantes reduziram a formação de placas de lise exibindo índices de seletividade na média de 0,6. As proteínas CB1+6xHis_opt e CB2+6xHis_opt podem vir a ser um importante modelo na prospecção de novas drogas antivirais e como ferramenta no estudo do mecanismo de replicação viral.

Palavras-chave: Antiviral. Produção recombinante. Febre amarela. Dengue. Fosfolipase A₂. Venenos de serpentes.

1. INTRODUÇÃO

A família *Flaviviridae* consiste em quatro gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pestivirus* e *Pegivirus*. O gênero *Flavivirus* compreende 53 vírus, muitos dos quais causam doenças em seres humanos, incluindo os vírus da febre amarela (YFV), da dengue (DENV), do oeste do Nilo (WNV), da Zika (ZIKV), da encefalite japonesa (JEV) e da encefalite transmitida por carrapato (TBEV), dentre outros (ICTV, 2016). Muitos desses vírus são importantes patógenos humanos que podem causar doenças febris, hemorrágica e do sistema nervoso central. Nas Américas, a dengue e a febre amarela são duas doenças virais transmitidas por artrópodes (arboviroses) de suma importância para a saúde pública. São consideradas doenças reemergentes devido ao aumento no número de casos registrados nos últimos anos (Mackenzie *et al.*, 2004; Wilder-Smith *et al.*, 2017).

Apesar da existência de vacinas licenciadas contra os YFV, JEV, TBEV e DENV, ainda existem centenas de vítimas em áreas endêmicas a cada ano. Isso ocorre, pois muitas vezes não existem campanhas de vacinação em massa contra essas viroses, resultando no aparecimento de casos esporádicos; ou quando as tem, a população só procura a vacinação durante surtos. Portanto, fármacos para terapia específica dessas viroses são de extrema importância. Todavia, não há, até o momento, terapia antiviral aprovada para uso contra flavivírus, o que torna os estudos nessa linha uma prioridade na saúde pública (Mackenzie *et al.*, 2004; Noble *et al.*, 2010).

As toxinas animais se mostraram potenciais fontes de novos fármacos em diversos estudos (Costa *et al.*, 2001; Earl *et al.*, 2012). Dentre elas, as fosfolipases A₂ (PLA₂) são proteínas multifuncionais com promissoras aplicações biotecnológicas. O amplo espectro de atividades das PLA₂s - devido aos seus perfis bioquímicos, toxicológicos, fisiológicos e farmacológicos - viabiliza a sua utilização como modelo na pesquisa de novos agentes terapêuticos (Dennis *et al.*, 2011; Murakami *et al.*, 2015). Uma melhor compreensão do mecanismo de ação antiviral dessa molécula tornará possível o desenho de uma molécula que seja minimamente tóxica mantendo o maior efeito antiviral possível. Por isso, destacamos seu uso como um possível modelo na prospecção de novas drogas antivirais.

1.1. DENGUE

A dengue é uma doença infecciosa não contagiosa causada pelo DENV (Ashburn e Craig, 1907). Estima-se que 390 milhões de pessoas se infectem por DENV anualmente em países tropicais e subtropicais, sendo que 96 milhões (≈25%) apresentam manifestações clínicas com diversos graus de gravidade (Bhatt *et al.*, 2013). Esses números tornam a dengue a mais

prevalente arbovirose em humanos nos últimos anos, tendo se tornado de grande prioridade na saúde pública mundial (Castro *et al.*, 2017). No Brasil, foram notificados 1.688.688 casos de dengue em 2015 e 1.500.535 em 2016. Até a 19ª semana epidemiológica de 2017 (01/01/17 a 13/05/17), foram notificados 144.326 casos de dengue (Brasil, 2017a).

Os vírus da dengue são tradicionalmente classificados em quatro sorotipos distintos (DENV-1, -2, -3, -4) (Sabin, 1950; Sweet e Sabin, 1954; Hammon *et al.*, 1960). A variação aminoacídica entre os sorotipos é de $\approx 25\text{-}40\%$; e cada sorotipo é classificado em genótipos que variam $\approx 6\%$ e $\approx 3\%$ em níveis de nucleotídeo e aminoácidos, respectivamente. Essa grande diversidade genética do DENV é propiciada pela sua distribuição global, o que propicia a rápida microevolução dos genótipos em diferentes regiões geográficas (Dowd *et al.*, 2015; Katzelnick *et al.*, 2015). Epidemias de dengue ocorrem a cada 3-5 anos durante a estação chuvosa em áreas endêmicas. Os primeiros estudos quanto a imunidade heterotípica (proteção cruzada contra infecção por um outro sorotipo) do DENV apontaram que esta durava de 2-3 meses (Sabin, 1952). Entretanto, estudos recentes de coorte estimam que a proteção imune heterotípica para DENV em alguns indivíduos possa durar 1-3 anos, demonstrando uma correlação entre o intervalo e frequência entre epidemias heterotípicas e a duração da proteção humoral contra DENV (Montoya *et al.*, 2013; Anderson *et al.*, 2014; Sharp *et al.*, 2017). Acreditava-se que a infecção pelo DENV, independente do sorotipo, produzia imunidade permanente contra re-infecção pelo mesmo sorotipo causador da doença, mas não contra outros sorotipos. Entretanto, estudos recentes têm documentado casos raros de re-infecção pelo mesmo sorotipo, principalmente em infecções causadas por DENV-2, o mais antigenicamente diverso (Katzelnick *et al.*, 2015; Sharp *et al.*, 2017).

O DENV é transmitido ao homem pela picada de mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*. A infecção pelo DENV pode ser assintomática e os casos sintomáticos são classificados em dengue grave ou dengue sem gravidade, sendo essa última subdividida em dengue sem sinais de alerta ou dengue com sinais de alerta (Who, 2009). Na dengue, a primeira manifestação é a febre, geralmente alta (39°C a 40°C), de início abrupto que pode estar associada a cefaléia, adinamia, mialgias, artralgias, dor retroorbitária e presença ou não de exantema e/ou prurido. Alguns sinais de alerta são: dor abdominal, vômito persistente, sinal clínico de acúmulo de fluido, aumento do fígado e sangramento de mucosas. Casos sem gravidade podem evoluir para formas graves da doença, em que indivíduos infectados passam a apresentar hemorragia grave e aumento da permeabilidade vascular com consequente choque hipovolêmico, que em alguns casos pode ser fatal (Who, 2009). Estudos epidemiológicos têm identificado a infecção secundária (infecção por um segundo sorotipo) e a presença de anticorpos pré-existentes contra

DENV como fatores de risco para desenvolvimento de dengue grave. Entretanto, apesar do grande número de infecções secundárias em áreas endêmicas, uma pequena percentagem de casos evolui para dengue grave. Acredita-se que fatores ambientais (condições epidemiológicas), virais (virulência das cepas) e do hospedeiro (etnia, idade) contribuem para o desenvolvimento da dengue grave (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2017).

Em alguns países como México, Filipinas e Brasil, uma vacina tetravalente contendo vírus quiméricos atenuados obtidos separadamente por tecnologia de DNA recombinante (Dengvaxia, Sanofi Pasteur, França) foi licenciada para uso na população, em que, as proteínas prM e E de cada um dos quatro sorotipos de DENV foram inseridas substituindo essas mesmas proteínas no genoma do vírus atenuado da vacina da febre amarela (17D204). A vacina é recomendada apenas para indivíduos entre 9 e 45 anos que não sejam alérgicos a nenhum componente da mesma, que não estejam imunossuprimidos e mulheres que não estejam grávidas ou amamentando (Sanofi, 2017). A taxa média de eficácia da vacina varia para cada sorotipo sendo que a média mundialmente é 54,7% para DENV-1; 43% para DENV-2; 71,6% para DENV-3; e 76,9% para DENV-4 (WHO, 2016a). Acredita-se que a proteção conferida pela vacina em uma área geográfica pode depender da coincidência dos genótipos do DENV presentes na vacina e aqueles que circulam naquela área (Usme-Ciro *et al.*, 2014), fato que pode explicar a grande variação na eficácia da vacina para cada sorotipo. Recentemente, tem se especulado sobre como a prévia exposição ao dengue aumenta a infecção por outros vírus como o ZIKV, o qual pertence ao mesmo gênero (Paul *et al.*, 2016).

Apesar da vacina, o principal método de combate à dengue ainda é o controle da população de vetores. Não existe nenhum agente terapêutico específico licenciado contra o DENV e o desenvolvimento de um tratamento é um desafio, já que, o modelo ideal de um fármaco contra DENV tem que ser eficaz contra os quatro sorotipos virais (Lai *et al.*, 2017; Pang *et al.*, 2017). Atualmente, no Brasil, há a circulação dos quatro sorotipos virais, o que aumenta a chance de casos graves da doença, e casos de co-infecção são frequentemente relatados em grandes epidemias (Mota *et al.*, 2016). Vários programas para o controle do vetor foram implantados pelas autoridades de saúde, como o “Brasil unido contra a dengue”, mas até agora nenhum foi realmente efetivo.

1.2. FEBRE AMARELA

A febre amarela é uma doença febril causada pelo YFV (Stokes *et al.*, 1928). Atualmente é endêmica nas regiões tropicais das Américas e da África apresentando-se como uma doença infecciosa leve até formas graves e fatais (Monath e Vasconcelos, 2015). O quadro

típico tem evolução bifásica com início abrupto de febre alta, calafrios, cefaleia, mialgias, prostração, náuseas e vômitos (período de infecção), após os quais se observa remissão da febre e melhora dos sintomas. O caso pode evoluir para cura ou para a forma grave (período de intoxicação) caracterizada pelo aumento da febre, diarreia e reaparecimento de vômitos, instalação de insuficiência hepática e icterícia, manifestações hemorrágicas e nos casos mais graves ocorre comprometimento do sistema sensorial (delírios e convulsões) com evolução para o coma e morte (Holbrook, 2017).

Existem dois ciclos de transmissão: o silvestre e o urbano. Nas Américas, a forma silvestre é mantida, principalmente, entre macacos e mosquitos hematófagos dos gêneros *Haemogogus* e *Sabethes*; o homem não imunizado se infecta acidentalmente quando penetra na floresta. Já a forma urbana é transmitida ao homem pela picada do mosquito *Aedes aegypti* (Weaver e Reisen, 2010). Um estudo de modelagem baseado em dados da África estimou que em 2013 ocorreram mundialmente 84.000-170.000 casos graves de febre amarela e 29.000-60.000 mortes (Who, 2016b). Atualmente, no Brasil, a febre amarela encontra-se restrita ao ciclo silvestre, porém ainda se teme a presença da febre amarela em áreas urbanas. Além disso, os casos da doença estão se dirigindo de seu epicentro original - central-norte do país - para estados mais populosos do sudeste (Pacca *et al.*, 2009).

Não existe agente antiviral contra o YFV, sendo a vacinação a mais importante medida de controle. A vacina (cepa 17D atenuada) é administrada em dose única e confere proteção acima de 95% (Collins e Barrett, 2017). Entretanto, mesmo existindo uma vacina contra a doença, o estudo de fármacos antivirais é muito importante, pois nem toda a população foi imunizada. Indivíduos com imunodepressão transitória ou permanente não podem ser vacinados devido ao elevado risco de desenvolver complicações após o uso da vacina, bem como a vacina nessas pessoas pode não impedir que a doença se instale (Julander, 2013; Wilder-Smith *et al.*, 2017). E ainda, indivíduos que possuam hipersensibilidade às proteínas do ovo, antibióticos e gelatina não podem ser imunizados, visto que os vírus vivos atenuados da vacina são cultivados em ovos embrionados de galinha e a composição final da vacina aplicada no Brasil inclui vírus vivos atenuados da subcepa 17DD, sacarose, glutamato, sorbitol, gelatina bovina, eritromicina e kanamicina (Brasil, 2008).

Outro método de prevenção da doença é o controle do vetor *Aedes aegypti* para eliminação do risco de reurbanização da mesma. Com o declínio de casos urbanos em muitas regiões endêmicas, os programas de vacinação perdem importância e o controle do vetor passa a ser a medida de prevenção adotada pela população (Monath e Vasconcelos, 2015). Com o descuido da população e dos órgãos governamentais de saúde, grandes surtos de febre amarela

tem sido cada vez mais frequentes, como a que ocorreu na Angola entre os anos de 2015 e 2016 (4347 casos suspeitos e 377 mortes) com surgimento de casos suspeitos na República Democrática do Congo (2800), Mauritânia (1), Quênia (2) e China (11) (Collins e Barrett, 2017). No Brasil, estima-se que a cobertura vacinal nas áreas de risco seja de 65,3%, considerado baixo (Brasil, 2014). Fato este que pode explicar o recente surto no Brasil, em que de 1º/12/16 a 31/05/17 foram confirmados 792 casos e 274 óbitos por infecção pelo YFV, um aumento significativo no número de casos quando comparado ao registrado entre julho/2014 e dezembro/2016 (15 casos confirmados) (Brasil, 2017b; c).

1.3. OUTRAS VIROSES CIRCULANTES NO BRASIL ATUALMENTE

Os vírus mais disseminados no Brasil atualmente são: da dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV), Zika (ZIKV) e Febre Amarela (YFV) (Donalisio *et al.*, 2017). A doença causada por CHIKV (gênero *Alphavirus*; família *Togaviridae*) se caracteriza por uma febre alta ($>39^{\circ}\text{C}$) súbita com concomitante artralgia persistente ou crônica (Tanay, 2017). O CHIKV é historicamente endêmico em países tropicais da África, sudeste Asiático e subcontinente Indiano. Entretanto, na última década, uma expansão geográfica substancial do vírus tem sido observada (Tjaden *et al.*, 2017). Os primeiros isolamentos de CHIKV no Brasil ocorreram em 2014 (Donalisio *et al.*, 2017). Embora o ZIKV (gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*) ocasione na maioria dos casos infecção assintomática ou uma doença febril leve, o tropismo incomum por células neurais pode levar ao desenvolvimento de defeitos neurológicos em recém-nascidos (microcefalia) e adultos (síndrome de Guillain-Barré) (Ali *et al.*, 2017; Wilder-Smith *et al.*, 2017). No Brasil, os primeiros isolamentos de ZIKV ocorreram em 2015 (Donalisio *et al.*, 2017).

1.4. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E MULTIPLICAÇÃO DOS FLAVIVÍRUS

O conhecimento da estrutura de um vírus e de seu ciclo de replicação é essencial para identificar potenciais alvos para o desenvolvimento de antivirais e, assim, obter informações fundamentais para o desenho de fármacos; bem como para elucidar o sítio/mecanismo de ação exato de um antiviral em estudo (Damonte *et al.*, 2004).

Os flavivírus (Figura 1) são esféricos com cerca de 50nm de diâmetro e consistem em um nucleocapsídeo envolvido pelo envelope viral, o qual é composto por uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira na qual estão ancoradas as glicoproteínas virais de superfície. O

RNA viral envolto pelo capsídeo consiste numa fita simples de RNA de senso positivo de aproximadamente 11 kilobases (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2011).

Figura 1. Estrutura da partícula viral dos flavivírus. A. Ilustração esquemática da disposição dos constituintes da partícula viral: proteínas E (envelope), M (membrana), C (capsídeo), envelope bilipídico e genoma (RNA); modificado de http://viralzone.expasy.org/24?outline=all_by_species. B. Crio-microscopia eletrônica e ilustração esquemática da reconstrução de partículas de flavivírus a temperatura ambiente (A) e a 37°C (B), modificado de Zhang *et al.* (2013).

O DENV exposto a temperaturas acima de 31°C é visualmente irregular/deformado e essa mudança parece ser irreversível (Figura 1). O perfil de transição conformacional em diferentes temperaturas do DENV sugere que a conformação irregular do DENV (“bumpy”) é a forma predominante nos seres humanos (37°C), com exposição do seu envelope (Fibriansah *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Kostyuchenko *et al.*, 2014).

O genoma viral possui cap no extremo 5’ para reconhecimento pelos ribossomos celulares e carece de cauda polyA no extremo 3’. A tradução do RNA viral ocorre em uma única fase de leitura (*open reading frame* - ORF). Nas extremidades 5’ e 3’, flanqueando a ORF, existem regiões não codificadoras (*untranslated regions* – UTRs) - a 5’-UTR e a 3’-UTR - com aproximadamente 95-101 e 450 nucleotídeos, respectivamente. Essas regiões possuem sequências conservadas e estruturas secundárias de RNA que são cruciais na iniciação e regulação dos processos de replicação, tradução e montagem viral. Após a tradução do RNA viral em uma grande poliproteína, a mesma é posteriormente clivada por proteases celulares e virais em 3 proteínas estruturais (capsídeo [C], pré-membrana [preM], envelope [E]) e 7

proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), que são requeridas na replicação do genoma e empacotamento de novas partículas virais (

Figura 2) (Pastorino *et al.*, 2010; Julander, 2013; Green *et al.*, 2014).

Figura 2. Organização estrutural geral do genoma e proteínas virais de um flavivírus. O genoma é constituído por uma fita simples de RNA de senso positivo de aproximadamente 11kb que possui uma única fase de leitura (*open reading frame*) e codifica uma poliproteína que será clivada por proteases celulares e virais em três proteínas estruturais e sete não estruturais. aa: aminoácidos; C: proteína do capsídeo; E: proteína do envelope; M: proteína de membrana; NS: proteína não estrutural; pr: peptídeo clivado do precursor da proteína de membrana; UTR: região não codificadora. Modificado de http://viralzone.expasy.org/24?outline=all_by_species.

A multiplicação viral (Figura 3) ocorre em células suscetíveis ao vírus. Devido a diferenças no meio intracelular e pela natureza não-lítica do ciclo dos flavivírus, a entrada, a replicação e o envelopamento desses vírus pode diferir nas células de mosquitos em comparação às células de vertebrados. A entrada das partículas virais se dá por endocitose mediada por clatrina através da ligação entre a proteína E e receptores da superfície celular, tais como DC-SIGN (molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intercelular 3 e específica das células dendríticas), TIM (domínios imunoglobulina e mucina de células T), TAM (TYRO3, AXL e MER) e receptores de porção Fc de anticorpos que opsonizam o vírus. Após a endocitose, ocorre fusão das vesículas endossomais, que contém os vírus, com os lisossomos, o que acarreta em uma diminuição do pH intra-endossômico, o ambiente ácido potencializa mudanças conformacionais na proteína E que resulta numa fusão do envelope viral

com a membrana dos endossomos e consequente desmontagem da partícula viral e liberação do RNA viral no citoplasma (Pastorino *et al.*, 2010; Green *et al.*, 2014; Screaton *et al.*, 2015). O RNA liberado no citoplasma codifica uma poliproteína precursora de aproximadamente 3400 aminoácidos. Esse polipeptídeo traduzido pelo hospedeiro sofre processamento co- e pós-traducional originando as três proteínas virais estruturais e as sete não estruturais através da clivagem realizada pelas proteases viral NS2B/NS3 e celulares.

Figura 3. Ciclo de multiplicação de um flavivírus. A infecção tem início com uma partícula viral (1) se ligando à um receptor de superfície (2) que medeia a endocitose viral (3). O RNA viral é liberado no citoplasma (4) e a sua tradução e processamento da poliproteína ocorrem no retículo endoplasmático (5). A replicação do RNA (6) e formação do nucleocapsídeo (7) ocorrem no citoplasma. A montagem das partículas virais ocorre por brotamento do nucleocapsídeo para o interior do retículo endoplasmático (8). A liberação viral das partículas virais ocorre por exocitose (9). DC-SIGN: lectina do tipo C específica de célula dendrítica; H⁺: pH baixo/ácido; pr: peptídeo clivado do precursor da proteína de membrana; RER: retículo endoplasmático rugoso. Modificado de Screaton e colaboradores (2015).

A replicação do genoma começa com a síntese da fita negativa do RNA (ssRNA⁻), a qual serve para a formação de uma fita dupla de RNA, a partir da qual são sintetizadas várias cópias de fitas positivas de RNA (ssRNA⁺) pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) viral – a proteína NS5. A proteína C junto com o RNA viral formam o nucleocapsídeo que se liga à porção citoplasmática das glicoproteínas virais ancoradas na membrana bilipídica do

retículo endoplasmático contendo heterodímeros das proteínas prM e E, resultando na montagem das partículas virais por brotamento para dentro do lúmen do retículo endoplasmático (RE). Vale ressaltar que por conta do brotamento para o interior do lúmen do RE, a composição fosfolipídica dos folhetos da bicamada lipídica dos vírus é invertida quando comparados com o de uma célula eucariótica; assim ocorre uma maior concentração de fosfolipídeos aniônicos em seu folheto externo. As partículas virais formadas no RE são imaturas e não infecciosas. Esses vírus imaturos são transportados pela via secretora celular até o complexo golgiense; onde no ambiente de baixo pH da face *trans* do complexo golgiense ocorre a clivagem de prM em M por furinas celulares levando à maturação da partícula viral. A maturação é acompanhada de rearranjo no envelope viral. Posteriormente, as partículas virais são liberadas para o meio extracelular pela via exocítica (Pastorino *et al.*, 2010; Green *et al.*, 2014; Screatton *et al.*, 2015).

É evidente que o uso de vacinas contra doenças virais tem os seus méritos, por ser uma medida profilática eficaz. E embora alguns vírus causadores de doenças no homem, como o da varíola, foram erradicados graças à vacinação; outras doenças virais, tais como a causada pelo HIV, tem se mostrado intratáveis à abordagem da vacina devido a dificuldades como assegurar a imunização contra todos os subtipos circulantes (De Clercq, 2002). Essas e outras dificuldades no tratamento de algumas viroses deveriam impulsionar o estudo de novos fármacos antivirais, já que há muitas situações em que drogas antivirais efetivas poderiam desempenhar um papel importante na gestão da saúde. Por exemplo, indivíduos não imunes, turistas e trabalhadores temporários provenientes de regiões não endêmicas são particularmente vulneráveis a infecções virais em países endêmicos. Imunocomprometidos, idosos e pessoas subnutridas também constituem grupos de alto risco. Por consequência, a disponibilidade de agentes antivirais poderia oferecer uma alternativa eficaz ou auxiliar a vacinação, tanto para o tratamento profilático sobre pessoas localizadas em áreas endêmicas como para o tratamento de pacientes gravemente enfermos (Pastorino *et al.*, 2010).

O ideal, então, seria o desenvolvimento de antivirais que exerçam amplo espectro de atividade com a menor toxicidade possível, já que em tratamentos de longo período como no HIV, por exemplo, é pertinente que os efeitos adversos sejam mínimos. Para tal êxito no desenvolvimento de fármacos antivirais, se faz necessária a interação e colaboração entre a bioquímica, a biomedicina e a indústria. Essa interação é de importância crucial na concepção de compostos, ao validar sua utilidade biomédica e ao desenvolvê-lo com sucesso no uso clínico (De Clercq, 2005; Leyssen *et al.*, 2008; De Clercq, 2010; Da Mata *et al.*, 2017).

1.5. O USO DE TOXINAS ANIMAIS NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

Ao longo da história, a humanidade sempre procurou na natureza formas de obter recursos para suas necessidades básicas. Muitos anos de observação e experimentação proveram o uso de produtos naturais na área biomédica. Cerca de 60% dos fármacos comercialmente disponíveis são baseados em compostos bioativos extraídos de fontes naturais. No Brasil, 326 espécies animais possuem registros na literatura de uso para fins medicinais (Alonso-Castro, 2014).

Dentre as fontes de recursos naturais, as toxinas animais tem se mostrado um grande potencial para a descoberta de novos fármacos (Da Mata *et al.*, 2017). As toxinas animais têm contribuído significativamente para o desenvolvimento das Ciências Biomédicas, pois estão envolvidas em processos imunológicos, farmacológicos e de intoxicação. Possuem uma extensa diversidade química, constituindo modelos moleculares interessantes para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas aplicáveis na geração de agentes terapêuticos ou de ferramentas experimentais para a pesquisa básica e aplicada. As toxinas animais possuem potenciais atividades farmacológicas que podem ser melhor estudadas e exploradas para futuras aplicações clínicas.

O veneno de serpentes é uma mistura de compostos bioativos, em sua maioria proteínas e peptídeos (90-95%), produzidos e estocados em glândulas de veneno altamente especializadas. E esses venenos têm se mostrado importantes devido às diversas propriedades bioquímicas, funcionais e estruturais de seus componentes. Na sua grande maioria são constituídos por inúmeras toxinas, em concentrações variadas (Doley e Kini, 2009; Da Mata *et al.*, 2017).

Existem no mercado agentes terapêuticos derivados de venenos de serpentes, tais como: o anti-hipertensivo Capoten (captopril) derivado de um peptídeo do veneno de *Bothrops jararaca*; e o Integrilin (eptifibatide) e o Aggrastat (tirofiban) - antiplaquetários derivados dos venenos de *Sistrurus miliaris barbouri* e de *Echis carinatus*, respectivamente (Earl *et al.*, 2012). E muitas outras toxinas animais em diversas fases de estudo (Koh *et al.*, 2006; Da Mata *et al.*, 2017).

1.6. FOSFOLIPASES A₂

Dentre as toxinas presentes no veneno de serpentes, as fosfolipases A₂ (PLA₂s, ou fosfatidil-acil hidrolases – E.C. 3.1.1.4) se destacam como enzimas importantes por estarem envolvidas em diversos processos de intoxicação e fisiológicos. As PLA₂s representam uma

classe de enzimas versáteis, considerando sua função, localização, regulação, mecanismo de ação, sequência aminoacídica e estrutura (Schaloske e Dennis, 2006). São comumente encontradas em uma variedade de fluídos biológicos e células como a saliva, líquidos sinoviais, macrófagos, plaquetas, pâncreas, baço, músculo liso, placenta e venenos de serpentes, abelhas e escorpiões. Sendo que, entre as serpentes, os venenos da família Viperidae, sub-família Crotalinae, que inclui o gênero *Crotalus*, possui uma alta atividade fosfolipásica (Varanda e Giannini, 1994; Kini, 2003). As fosfolipases A₂ podem ser divididas em cinco grupos principais: PLA₂ secretórias (sPLA₂), citosólicas (cPLA₂), cálcio (Ca²⁺) independentes, acetilhidrolases fator de agregação plaquetária (PAF-AH) e as lisossômicas (Schaloske e Dennis, 2006). As PLA₂s secretórias foram subdivididas em quinze grupos, de acordo com o número de resíduos de aminoácidos e posição das ligações dissulfeto, sendo que as PLA₂s dos venenos de serpentes estão incluídas nos grupos I e II entre as secretórias (Valentin e Lambeau, 2000; Schaloske e Dennis, 2006). Apesar da pequena variação sequencial e estrutural, as sPLA₂s desempenham importantes papéis biológicos, que podem ou não estar relacionados à sua atividade enzimática. A atividade catalítica das sPLA₂s se dá principalmente no catabolismo de lipídeos da dieta e no metabolismo geral de lipídeos estruturais das membranas celulares, onde catalisam a hidrólise, especificamente, na ligação acil-éster na posição *sn*-2 de fosfolipídios, liberando como produtos lisofosfolipídios e ácidos graxos livres (Figura 4) (Valentin e Lambeau, 2000; Kini, 2003). As PLA₂s hidrolisam fosfolípidos em monômeros, em micelas ou em bicamadas lipídicas; porém agem melhor sobre substratos fosfolípides quando esses estão em estruturas agregadas como micelas ou membranas (Dennis *et al.*, 1981; Kini, 2003). O local de reconhecimento do fosfolipídio, um sítio independente do sítio catalítico, é responsável pela propriedade incomum de se ligarem à interface entre a fase polar aquosa e as cadeias apolares do fosfolipídio (Kini, 2003).

Figura 4. A diversidade e os sítios de atuação das fosfolipases. As fosfolipases A₁ e A₂ hidrolisam as ligações éster de glicerofosfolipídios intactos nos carbonos C-1 e C-2 do glicerol, respectivamente. As fosfolipases C e D quebram, cada uma delas, uma das ligações fosfodiéster no grupo fosfato. A hidrólise de um fosfolipídeo pela PLA₂ resulta em ácido graxo e lisofosfolipídeo como produtos. Modificado de (Berg *et al.*, 2008).

A estrutura terciária básica das PLA₂s (), cujo enovelamento típico é determinado, em grande parte, pelas pontes dissulfeto, é caracterizada pela presença de uma região N-terminal formada por uma α -hélice I (h1) (resíduos 1-12) - a qual está envolvida na ligação e orientação de substratos à proteína (canal hidrofóbico) - em seguida tem-se a hélice curta (*short helix*) (resíduos 18-23), o *loop* ligante do íon Ca^{2+} (resíduos 25-34), a α -hélice II (h2) (resíduos 40-55), duas folhas β -pregueadas antiparalelas (β -wing) (resíduos 75-77 e 82-84), a α -hélice III (h3) (resíduos 90-107) e por fim a região bastante flexível C-terminal (resíduos 108-133). Os segmentos h2 e h3 alocaam resíduos que constituem o sítio catalítico das PLA₂s (Arni e Ward, 1996; Ward *et al.*, 1998).

Figura 5. Estrutura terciária básica das fosfolipases A₂. Enovelamento de uma PLA₂s mostrando as estruturas secundárias (h1, *loop* ligante de Ca^{2+} , h2, β -wing, h3 e *loop* C-terminal). Destaque para os resíduos constituintes do sítio catalítico (H48, D49, Y52 e D99) e para as pontes dissulfeto (linhas pretas contínuas). Modificado de (Ketelhut *et al.*, 2003).

Para as sPLA₂s que constituem o grupo II, o íon Ca^{2+} , um resíduo de histidina (His) na posição 48 e um de aspartato (Asp) na posição 49 são requeridos para a catálise de substratos artificiais (PLA₂ Asp49). Isso, pois as sPLA₂s usam o resíduo His48, assistido pelo Asp99, para polarizar moléculas de água e causar um ataque nucleofílico na ligação 2-acil-éster de fosfolipídios. A tirosina Tyr52 entra em ação para estabilizar a carga da proteína promovendo uma rede de pontes de hidrogênio que permitirá o ataque nucleofílico e consequente quebra do fosfolipídio e rearranjo das cargas da proteína. O íon Ca^{2+} ao se ligar ao *loop* ligante de Ca^{2+} -

formado pelos resíduos de tirosina na posição 28 (Tyr28), dois de glicina nas posições 30 e 32 (Gly30 e Gly32) e o Asp49 - estabiliza a molécula da PLA₂ e funciona como um cofator essencial no mecanismo de hidrólise, em que na sua ausência, as sPLA₂s são cataliticamente inativas. (Yu *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2001; Chakraborti, 2003; Perumal Samy *et al.*, 2010). E esse é um dos motivos pelos quais as PLA₂s que possuem uma lisina (Lys) na posição 49 (PLA₂ Lys49), como a Bothropstoxina I (BthTX-I), por exemplo, apresentam muito baixa ou nenhuma atividade enzimática sobre substratos fosfolípidos artificiais (*in vitro*) (Fletcher e Jiang, 1998; Ward *et al.*, 2002b).

As PLA₂s têm sido amplamente estudadas quanto as suas diversas funções e aplicabilidades biomédicas; e em sua maioria, esses estudos utilizaram formas recombinantes das moléculas e mutações sítio dirigidas. A revisão feita por Chioato e colaboradores (2003), enumera 29 trabalhos da literatura, nos quais as PLA₂s de venenos de serpentes foram expressas, em sua grande maioria, em sistemas procarióticos (Chioato e Ward, 2003). No Brasil, dois grupos conseguiram expressar PLA₂s isoladas de serpentes com sucesso: (Ward *et al.*, 2001) expressaram a BthTX-I utilizando o vetor de expressão pET11d para transformar células BL21(DE3)pLysS competentes; e (Silveira *et al.*, 2013) expressaram uma fosfolipase A₂ ácida isolada de *Bothrops moojeni* (BmooPLA₂) utilizando o vetor de expressão pET-21a no sistema BL21(DE3)pLysS.

Por outro lado, as PLA₂s têm mostrado potencial ação sobre alguns vírus. Por exemplo, (Mitsuiishi *et al.*, 2006) descreveram a inibição da multiplicação de adenovírus em células 293A devido à adição de PLA₂s humanas recombinantes. (Fenard *et al.*, 1999) descreveram a inibição da replicação de HIV-1 em células mononucleares do sangue periférico por uma PLA₂ isolada do veneno de abelha, a qual inibe a entrada viral através de um mecanismo vinculado a ligação da PLA₂ as células. (Kim *et al.*, 2007) descreveram a ação antiviral contra HIV-1, vírus ebola, adenovírus tipo 5 e vírus da leucemia em ratos de uma sPLA₂ humana (grupo X) recombinante. (Anderson e Ada, 1960) e (Drayton, 1961) descreveram a ação antiviral de uma PLA₂ isolada do veneno de *Pseudechis porphyriacus* sobre o Vírus da Encefalite do Vale de Murray e o oncovírus RSV (Vírus do Sarcoma de Rous), respectivamente. (Kohn e Klibansky, 1967) descreveram a ação de PLA₂s isoladas dos venenos de *Vipera palestinae*, *Naja naja* e *Ringhals cobra* inativando o Vírus da Doença de Newcastle. Nosso grupo demonstrou a atividade antidengue e antifebre amarela de três PLA₂s isoladas de venenos de serpentes – a PLA₂-CB e a PLA₂-IC (“inter-cro”) isoladas de *Crotalus durissus terrificus*, e a bothropstoxina I (BthTX-I) isolada de *Bothrops jararacussu* (Muller *et al.*, 2012); bem como, evidenciamos que a ação antiviral da PLA₂-CB se dá sobre outros vírus envelopados e que embora a sua ação enzimática

tenha um importante papel no alto desempenho antiviral, essa não é restrita à atividade catalítica apenas (Muller *et al.*, 2014; Russo *et al.*, 2014).

1.7. FOSFOLIPASE A₂ CROTOXINA B (PLA₂-CB)

A crotoxina (crtx) foi a primeira toxina animal a ser isolada e cristalizada (Slota e Fraenkel-Conrat, 1938), sendo o principal componente do veneno das serpentes do gênero *Crotalus*. A crotoxina (Figura 6) é um complexo proteico heterodimérico reversível composto por um polipeptídeo ácido não tóxico e sem atividade enzimática, a crotapotina (CA, ou crotoxina A ou componente ácido), e um componente básico (CB, ou crotoxina B), responsável pela toxicidade e atividade biológica do complexo, a PLA₂-CB (Hendon e Fraenkel-Conrat, 1971; Rübsamen *et al.*, 1971). A crotapotina, quando complexada a PLA₂-CB, ou seja, na forma de crotoxina, aumenta a atividade da PLA₂-CB por agir como uma chaperona, prevenindo a ligação da PLA₂-CB a sítios não específicos. Assim, após a ligação ao sítio de ação, o complexo PLA₂-CB+crotapotina se dissocia e as atividades biológicas creditadas a crotoxina são decorrentes da ação da PLA₂-CB, a qual é uma PLA₂ Asp49 (Doley e Kini, 2009).

Figura 6. Estrutura da crotoxina e formação de tetrâmeros pelas isoformas da PLA₂-CB. A crotoxina é um heterodímero formado pela ligação não-covalente entre a chaperona crotapotina e a PLA₂-CB (Modificado de (Faure *et al.*, 2011)). Quando livres em solução, as isoformas da PLA₂-CB tendem a se dimerizar e formar tetrâmeros. Modificado de (Marchi-Salvador *et al.*, 2008).

Duas isoformas da PLA₂-CB de massas moleculares de 14.180Da (CB1) e 14.244Da (CB2) foram previamente identificadas no veneno de *Crotalus durissus terrificus*. As isoformas diferem entre si por oito aminoácidos (resíduos nas posições 1, 18, 33, 65, 82, 105, 106, 117). Estas substituições resultam em modificações nas atividades enzimáticas e farmacológicas: a isoforma CB2 apresenta elevada atividade enzimática e baixa toxicidade enquanto que CB1

exerce baixa atividade enzimática e alta toxicidade (Faure e Bon, 1988; Faure *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2004; Faure *et al.*, 2011). Aparentemente, CB1 e CB2 são expressas diferentemente no veneno; e na espécie *Crotalus mitchelli mitchelli* apenas a CB2 é expressa no veneno, o que possivelmente explica a baixa letalidade do veneno dessa espécie quando comparado com o da *Crotalus durissus terrificus* que contém também a CB1 (Chen *et al.*, 2004).

A PLA₂-CB em solução pode se apresentar com dímero ou tetrâmero, entretanto, a forma predominante é a tetrâmica (Figura 6). A estrutura tetrâmica é formada pela associação de dois dímeros de CB1/CB2. É possível que após a dissociação do complexo da crotoxina, a complexação dessas isoformas ocorra. É provável que as isoformas CB1 e CB2 operem como partes complementares de um complexo molecular funcional, em que a configuração tetrâmica, e até mesmo a dimérica, seja essencial para as atividades biológicas exercidas pela crotoxina B (Marchi-Salvador *et al.*, 2008; Sampaio *et al.*, 2010).

Ambas as isoformas possuem sete pontes dissulfeto e apresentam a porção N-terminal em α -hélice (h1), um *loop* ligante de Ca^{2+} , duas α -hélices anti-paralelas (h2 e h3), duas β -folhas curtas antiparalelas (β wing) e um *loop* C-terminal. A região catalítica formada por His48, Tyr52, Tyr73 e Asp99 é altamente conservada nas duas isoformas. E nas formas tetrâmicas e dímeras, apenas CB1 apresentou a presença do íon Ca^{2+} ligado ao *loop*. As principais diferenças estruturais entre CB1 e CB2 são o *loop* ligante de Ca^{2+} (resíduos 27 – 34), a região C-terminal (resíduos 119 – 133) e a região β wing com seus dois *loops* adjacentes (resíduos 53 – 91) (Marchi-Salvador *et al.*, 2008).

As isoformas CB1 e CB2 provavelmente interagem para formar um complexo molecular a fim de apoiar ou maximizar uma atividade em detrimento da atividade catalítica, que certamente é afetada pela mudança do cálcio-ligante de um monômero em cada dímero causado pela oligomerização (Marchi-Salvador *et al.*, 2008).

Em um organismo a PLA₂-CB exibe atividade neurotóxica atuando na junção neuromuscular inibindo a liberação de neurotransmissores. Dessa forma, realiza um bloqueio pré-sináptico ao impedir a liberação da acetilcolina (Sampaio *et al.*, 2010). A PLA₂-CB medeia uma série de atividades imunomodulatórias e farmacológicas amplamente exploradas em diversos trabalhos (Costa *et al.*, 1998; Santamaría *et al.*, 2005; Costa e Villarrubia, 2007; Almeida *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2017). Portanto, a obtenção dessas enzimas em grande quantidade através de técnicas de biotecnologia, é de grande interesse no estudo e desenvolvimento de novos produtos terapêuticos, tais como agentes antivirais.

5.0. CONCLUSÃO

- As proteínas recombinantes CB1-6xHis_opt e CB2-6xHis_opt foram expressas em *E. coli* nas cepas BL21(DE3), Origami B(DE3) e ArcticExpress (DE3) e sua correta expressão foi confirmadas por *Western Blotting*.
- A expressão das proteínas recombinantes se deu de forma insolúvel em todas as cepas bacterianas analisadas mesmo após procedimentos de otimização da expressão.
- A melhor estratégia de renaturação das proteínas recombinantes foi aquela realizada *on-column* utilizando um gradiente decrescente de ureia contendo 0,5% CHAPS com pH= 7,0.
- Ambas as proteínas CB2-6xHis_opt e CB1-6xHis_opt apresentaram atividade fosfolipásica, indicando a preservação do sítio catalítico.
- Ambas as proteínas CB2-6xHis_opt e CB1-6xHis_opt apresentaram atividade virucida contra DENV-2, YFV, CHIKV e ZIKV, confirmando o efeito sobre vírus envelopados.
- CB1-6xHis_opt e CB2-6xHis_opt podem vir a ser um importante modelo na prospecção de novas drogas antivirais e como ferramenta no estudo do mecanismo de replicação viral.

6.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAM, M. E. et al. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. **J Virol**, v. 84, n. 19, p. 9864-78, Oct 2010. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20660205> >.

ALI, S. et al. Environmental and Social Change Drive the Explosive Emergence of Zika Virus in the Americas. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 2, p. e0005135, Feb 2017. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28182667> >.

ALIBOLANDI, M.; MIRZAHOSEINI, H. Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies. **Biochem Res Int**, v. 2011, p. 631607, 2011. ISSN 2090-2255. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822494> >.

ALMEIDA, C. E. S. et al. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* is able to down-modulate the acute intestinal inflammation in mice. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0121427, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25853847> >.

ALONSO-CASTRO, A. J. Use of medicinal fauna in Mexican traditional medicine. **J Ethnopharmacol**, v. 152, n. 1, p. 53-70, Feb 2014. ISSN 1872-7573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24440438> >.

ANDERSON, K. B. et al. A shorter time interval between first and second dengue infections is associated with protection from clinical illness in a school-based cohort in Thailand. **J Infect Dis**, v. 209, n. 3, p. 360-8, Feb 2014. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23964110> >.

ANDERSON, S. G.; ADA, G. L. A lipid component of Murray Valley encephalitis virus. **Nature**, v. 188, p. 876, Dec 1960. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13683280> >.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A2--a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827-41, Aug 1996. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8875770> >.

ASHBURN, P. M.; CRAIG, C. F. Experimental investigations regarding the etiology of Dengue Fever. **J Infect Dis**, v. 4, n. 3, p. 440-475, 1907.

BAESHEN, M. N. et al. Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current scenario and future perspectives. **J Microbiol Biotechnol**, Mar 2015. ISSN 1738-8872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25737124> >.

BEERS, S. A. et al. Effect of tryptophan insertions on the properties of the human group IIA phospholipase A2: mutagenesis produces an enzyme with characteristics similar to those of the human group V phospholipase A2. **Biochemistry**, v. 42, n. 24, p. 7326-38, Jun 2003. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12809488> >.

BERG, J. M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica**. 6ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-7, Apr 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563266> >.

BRASIL. **Biblioteca Virtual em Saúde**. Febre Amarela 2008.

_____. **Boletim Epidemiológico - Aspectos epidemiológicos da febre amarela silvestre e a vigilância intensificada durante período de monitoramento, Brasil, 2012/2013**: Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde 2014.

_____. **Boletim epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 19, 2017**. SAÚDE, M. D. S.-S. D. V. E. 48 2017a.

_____. **Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública sobre febre amarela**. SAÚDE, M. D. S.-S. D. V. E. 2017b.

_____. **Situação Epidemiológica no Brasil da febre amarela**. SAÚDE, M. D. S.-S. D. V. E. 2017c.

BRITTO, P. J.; KNIPLING, L.; WOLFF, J. The local electrostatic environment determines cysteine reactivity of tubulin. **J Biol Chem**, v. 277, n. 32, p. 29018-27, Aug 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023292> >.

BURLENSON, F. G.; CHAMBERTS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. **Virology: a laboratory manual**. San Diego: Academic, 1992.

CASTRO, M. C.; WILSON, M. E.; BLOOM, D. E. Disease and economic burdens of dengue. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 3, p. e70-e78, Mar 2017. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28185869> >.

CHAKRABORTI, S. Phospholipase A(2) isoforms: a perspective. **Cell Signal**, v. 15, n. 7, p. 637-65, Jul 2003. ISSN 0898-6568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12742226> >.

CHEN, Y. H. et al. Molecular evolution and structure-function relationships of crotoxin-like and asparagine-6-containing phospholipases A2 in pit viper venoms. **Biochem J**, v. 381, n. Pt 1, p. 25-34, Jul 2004. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032748> >.

CHIOATO, L.; WARD, R. J. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A2 by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 869-83, Dec 2003. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15019488> >.

CHIU, W.; JENG, T. W. Electron Diffraction Study of Crotoxin Complex At 1.6 Å. In: BAUMEISTER, W. V., W. (Ed.). **Electron Microscopy at Molecular Dimensions**: Springer Berlin Heidelberg, 1980. p.137-142.

CHOUMET, V. et al. Immunochemical analysis of a snake venom phospholipase A2 neurotoxin, crotoxin, with monoclonal antibodies. **Mol Immunol**, v. 29, n. 7-8, p. 871-82, 1992 Jul-Aug 1992. ISSN 0161-5890. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1378931> >.

COLLINS, N. D.; BARRETT, A. D. Live Attenuated Yellow Fever 17D Vaccine: A Legacy Vaccine Still Controlling Outbreaks In Modern Day. **Curr Infect Dis Rep**, v. 19, n. 3, p. 14, Mar 2017. ISSN 1523-3847. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28275932> >.

COSTA, L. A. et al. In vivo effect of snake phospholipase A2 (crotoxin+cardiotoxin) on serum IL-1alpha, TNF-alpha and IL-1ra level in humans. **Immunol Lett**, v. 75, n. 2, p. 137-41, Jan 2001. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137138> >.

_____. Tumor regression of advanced carcinomas following intra- and/or peri-tumoral inoculation with VRCTC-310 in humans: preliminary report of two cases. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 20, n. 1, p. 15-25, Feb 1998. ISSN 0892-3973. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9543697> >.

COSTA, L. A.; VILLARRUBIA, V. G. **Use of a phospholipase A2 for the preparation of pharmaceutical and/or cosmetic compositions for the local and/or systematic treatment and/or prevention of diseases and/or processes caused by intra- and extracellular pathogens expressing membrane phospholipids**. US20040166104 A1 2007.

COWGILL, C.; OZTURK, A. G.; JOHN, R. S. Protein Refolding and scale up. In: SHUKLA, A. A.; ETZEL, M. R., et al (Ed.). **Process Scale Bioseparations for the Biopharmaceutical Industry**: CRC Press, 2007. cap. 4, p.123-154.

DA MATA, É. et al. Antiviral activity of animal venom peptides and related compounds. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 23, p. 3, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28074089> >.

DAMONTE, E. B.; PUJOL, C. A.; COTO, C. E. Prospects for the therapy and prevention of dengue virus infections. **Adv Virus Res**, v. 63, p. 239-85, 2004. ISSN 0065-3527. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530563> >.

DE CLERCQ, E. Strategies in the design of antiviral drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 1, p. 13-25, 2002. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000178730800011 >.

_____. Antiviral drug discovery and development: where chemistry meets with biomedicine. **Antiviral Res**, v. 67, n. 2, p. 56-75, Aug 2005. ISSN 0166-3542. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16046240> >.

_____. In search of a selective therapy of viral infections. **Antiviral Res**, v. 85, n. 1, p. 19-24, Jan 2010. ISSN 1872-9096. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19852983> >.

DE MARCO, A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. **Microb Cell Fact**, v. 8, p. 26, 2009. ISSN 1475-2859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442264> >.

DENNIS, E. A. et al. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chem Rev**, v. 111, n. 10, p. 6130-85, Oct 2011. ISSN 1520-6890. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21910409> >.

_____. Cobra venom phospholipase A2: a review of its action toward lipid/water interfaces. **Mol Cell Biochem**, v. 36, n. 1, p. 37-45, Apr 1981. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7242529> >.

DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 17, p. 2851-71, Sep 2009. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19495561> >.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; VON ZUBEN, A. P. B. **Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública**. Rev. Saúde Pública. 51 2017.

DOWD, K. A.; DEMASO, C. R.; PIERSON, T. C. Genotypic Differences in Dengue Virus Neutralization Are Explained by a Single Amino Acid Mutation That Modulates Virus Breathing. **MBio**, v. 6, n. 6, p. e01559-15, Nov 2015. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26530385> >.

DRAYTON, H. A. Inactivation of Rous virus by phospholipase A. **Nature**, v. 192, p. 896, Dec 1961. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13887755> >.

EARL, S. T. et al. Drug development from Australian elapid snake venoms and the Venomics pipeline of candidates for haemostasis: Textilinin-1 (Q8008), Haempatch™ (Q8009) and CoVase™ (V0801). **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 456-63, Mar 2012. ISSN 1879-3150. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21184772> >.

ELENA, C. et al. Expression of codon optimized genes in microbial systems: current industrial applications and perspectives. **Front Microbiol**, v. 5, p. 21, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24550894> >.

FAURE, G.; BON, C. Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. **Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 730-8, Jan 1988. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3349062> >.

FAURE, G. et al. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Eur J Biochem**, v. 223, n. 1, p. 161-4, Jul 1994. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8033889> >.

FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F. A. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β -neurotoxin. **J Mol Biol**, v. 412, n. 2, p. 176-91, Sep 2011. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21787789> >.

FENARD, D. et al. Secreted phospholipases A(2), a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. **J Clin Invest**, v. 104, n. 5, p. 611-8, Sep 1999. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10487775> >.

FERRER, M. et al. Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. **Nat Biotechnol**, v. 21, n. 11, p. 1266-7, Nov 2003. ISSN 1087-0156. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14595348> >.

FERRÉ, H. et al. A novel system for continuous protein refolding and on-line capture by expanded bed adsorption. **Protein Sci**, v. 14, n. 8, p. 2141-53, Aug 2005. ISSN 0961-8368. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16046630> >.

FIBRIANSAH, G. et al. Structural changes in dengue virus when exposed to a temperature of 37°C. **J Virol**, v. 87, n. 13, p. 7585-92, Jul 2013. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23637405> >.

FLETCHER, J. E.; JIANG, M. S. LYS49 phospholipase A2 myotoxins lyse cell cultures by two distinct mechanisms. **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1549-55, Nov 1998. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792171> >.

FRANCISCETTI, I. M. et al. Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 127, n. 1, p. 23-36, Aug 2000. ISSN 1532-0456. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11081410> >.

GARCÍA, C. C. et al. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. **Phytother Res**, v. 17, n. 9, p. 1073-5, Nov 2003. ISSN 0951-418X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14595590> >.

GREEN, A. M. et al. Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. **J Mol Biol**, v. 426, n. 6, p. 1148-60, Mar 2014. ISSN 1089-8638. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24316047> >.

HAMMON, W. M.; RUDNICK, A.; SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. **Science**, v. 131, n. 3407, p. 1102-3, Apr 1960. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14399343> >.

HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 68, n. 7, p. 1560-3, Jul 1971. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5283946> >.

HJELMELAND, L. M. A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: design and synthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 77, n. 11, p. 6368-70, Nov 1980. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6935651> >.

HOLBROOK, M. R. Historical Perspectives on Flavivirus Research. **Viruses**, v. 9, n. 5, Apr 2017. ISSN 1999-4915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28468299> >.

HOMSIBRANDEBURGO, M. I. et al. FRACTIONATION OF BOTHROPS-JARARACUSSU SNAKE-VENOM - PARTIAL CHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL-ACTIVITY OF BOTHROPSTOXIN. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 615-627, 1988. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1988P223400002 >.

ICTV. **Virus Taxonomy: 2016 Release** 2016.

JAENICKE, R. Folding and association of proteins. **Biophys Struct Mech**, v. 8, n. 4, p. 231-56, 1982. ISSN 0340-1057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7052154> >.

JULANDER, J. G. Experimental therapies for yellow fever. **Antiviral Res**, v. 97, n. 2, p. 169-79, Feb 2013. ISSN 1872-9096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23237991> >.

KATZELNICK, L. C. et al. Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. **Science**, v. 349, n. 6254, p. 1338-43, Sep 2015. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26383952> >.

KETELHUT, D. F. et al. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A2 isoforms from Bothrops jararacussu snake venom. **Biochimie**, v. 85, n. 10, p. 983-91, Oct 2003. ISSN 0300-9084. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644553> >.

KIM, J. O. et al. Lysis of human immunodeficiency virus type 1 by a specific secreted human phospholipase A2. **J Virol**, v. 81, n. 3, p. 1444-50, Feb 2007. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17093191> >.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-40, Dec 2003. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15019485> >.

KOH, D. C.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 24, p. 3030-41, Dec 2006. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17103111> >.

KOHN, A.; KLIBANSKY, C. Studies on the inactivation of cell-fusing property of Newcastle disease virus by phospholipase A. **Virology**, v. 31, n. 2, p. 385-8, Feb 1967. ISSN 0042-6822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6021100> >.

KOSTYUCHENKO, V. A. et al. Near-atomic resolution cryo-electron microscopic structure of dengue serotype 4 virus. **J Virol**, v. 88, n. 1, p. 477-82, Jan 2014. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24155405> >.

KOZMINSKY-ATIAS, A.; ZILBERBERG, N. Molding the business end of neurotoxins by diversifying evolution. **FASEB J**, v. 26, n. 2, p. 576-86, Feb 2012. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22009937> >.

LAI, J. H.; LIN, Y. L.; HSIEH, S. L. Pharmacological intervention for dengue virus infection. **Biochem Pharmacol**, v. 129, p. 14-25, Apr 2017. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28104437> >.

LEE, W. H. et al. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A2--a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. **Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 28-36, Jan 2001. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11141053> >.

LEYSEN, P.; DE CLERCQ, E.; NEYTS, J. Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. **Antiviral Res**, v. 78, n. 1, p. 9-25, Apr 2008. ISSN 0166-3542. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18313769> >.

LIMA, T. S. et al. Crotoxin, a rattlesnake toxin, down-modulates functions of bone marrow neutrophils and impairs the Syk-GTPase pathway. **Toxicon**, v. 136, p. 44-55, Sep 2017. ISSN 1879-3150. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28688804> >.

LÔBO DE ARAÚJO, A.; RADVANYI, F. Determination of phospholipase A2 activity by a colorimetric assay using a pH indicator. **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1181-8, 1987. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3433293> >.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nat Med**, v. 10, n. 12 Suppl, p. S98-109, Dec 2004. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15577938> >.

MAJORS, R. E. Column Pressure Considerations in Analytical HPLC. **LCGC North America**, v. 25, n. 11, p. 1074-1092, 2007.

MARCHI-SALVADOR, D. P. et al. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Proteins**, v. 72, n. 3, p. 883-91, Aug 2008. ISSN 1097-0134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18275084> >.

MEINANDER, N. Q.; JEPSSON, M.; SOGAARD, M. Optimisation of the solubility of ItkKD in *E. coli*. In: MERTEN, O. W. M., D.LANG, C.LARSSON, G.NEUBAUER, P.PORRO, D.POSTMA, P.TEIXEIRA DE MATTOS, J.COLE, J. A. (Ed.). **Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells. A Comparative View on Host Physiology**: Springer Netherlands, v.1, 2001. p.159-170.

MITSUISHI, M. et al. Group V and X secretory phospholipase A2 prevents adenoviral infection in mammalian cells. **Biochem J**, v. 393, n. Pt 1, p. 97-106, Jan 2006. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16146426> >.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. Yellow fever. **J Clin Virol**, v. 64, p. 160-73, Mar 2015. ISSN 1873-5967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25453327> >.

MONTOYA, M. et al. Symptomatic versus inapparent outcome in repeat dengue virus infections is influenced by the time interval between infections and study year. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 8, p. e2357, 2013. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23951377> >.

MOTA, M. T. et al. Mosquito-transmitted viruses - the great Brazilian challenge. **Braz J Microbiol**, v. 47 Suppl 1, p. 38-50, Dec 2016. ISSN 1678-4405. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27818091> >.

MULLER, V. D. et al. Crotoxin and phospholipases A(2) from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 507-15, Mar 2012. ISSN 1879-3150. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21723310> >.

_____. Phospholipase A2 isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* inactivates dengue virus and other enveloped viruses by disrupting the viral envelope. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112351, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25383618> >.

MURAKAMI, M. et al. A New Era of Secreted Phospholipase A2 (sPLA2). **J Lipid Res**, Mar 2015. ISSN 0022-2275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25805806> >.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1328.

NOBLE, C. G. et al. Strategies for development of Dengue virus inhibitors. **Antiviral Res**, v. 85, n. 3, p. 450-62, Mar 2010. ISSN 1872-9096. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060421> >.

PACCA, C. C. et al. RNA interference inhibits yellow fever virus replication in vitro and in vivo. **Virus Genes**, v. 38, n. 2, p. 224-31, Apr 2009. ISSN 0920-8569. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19169857> >.

PANG, T.; MAK, T. K.; GUBLER, D. J. Prevention and control of dengue-the light at the end of the tunnel. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 3, p. e79-e87, Mar 2017. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28185870> >.

PASTORINO, B. et al. Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. **Antiviral Res**, v. 87, n. 3, p. 281-94, Sep 2010. ISSN 1872-9096. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20452379> >.

PAUL, L. M. et al. Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. **Clin Transl Immunology**, v. 5, n. 12, p. e117, Dec 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28090318> >.

PERERA-LECOIN, M. et al. Flavivirus entry receptors: an update. **Viruses**, v. 6, n. 1, p. 69-88, Dec 2013. ISSN 1999-4915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24381034> >.

PERUMAL SAMY, R. et al. Identification and characterization of a phospholipase A2 from the venom of the Saw-scaled viper: Novel bactericidal and membrane damaging activities. **Biochimie**, v. 92, n. 12, p. 1854-66, Dec 2010. ISSN 1638-6183. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20723574> >.

PONCE-SOTO, L. A. et al. Biological and structural characterization of crotoxin and new isoform of crotoxin B PLA(2) (F6a) from *Crotalus durissus collilineatus* snake venom. **Protein J**, v. 26, n. 4, p. 221-30, Jun 2007. ISSN 1572-3887. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17203389> >.

PRINZ, W. A. et al. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. **J Biol Chem**, v. 272, n. 25, p. 15661-7, Jun 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9188456> >.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 16, p. 2773-86, Aug 2010. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20372965> >.

_____. Partial maturation: an immune-evasion strategy of dengue virus? **Trends Microbiol**, v. 19, n. 5, p. 248-54, May 2011. ISSN 1878-4380. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21388812> >.

RUSSO, R. R. et al. Phospholipase A₂ crotoxin B isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* exert antiviral effect against Dengue Virus and Yellow Fever Virus through its catalytic activity. **Journal of Virology & Antiviral Research** v. 3, n. 1, p. 3, 2014.

RÜBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 270, n. 3, p. 274-88, 1971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4254625> >.

SABIN, A. The dengue group of viruses and its family relationships. **Bacteriol Rev**, v. 14, n. 3, p. 225-32, Sep 1950. ISSN 0005-3678. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14772197 >.

SABIN, A. B. Research on dengue during World War II. **Am J Trop Med Hyg**, v. 1, n. 1, p. 30-50, Jan 1952. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14903434> >.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMPAIO, S. C. et al. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1045-60, Jun 2010. ISSN 1879-3150. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20109480> >.

SAN-MIGUEL, T.; PÉREZ-BERMÚDEZ, P.; GAVIDIA, I. Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. **Springerplus**, v. 2, n. 1, p. 89, Dec 2013. ISSN 2193-1801. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23525091> >.

SANOPI. DENGVAIXIA®: vacina dengue 1, 2, 3 e 4 (recombinante e atenuada). 2017. Disponível em: < http://www.sanofipasteur.com.br/sites/www.sanofipasteur.com.br/files/sites/default/files/pictures/Dengvaxia_Bula%20Paciente.pdf >. Acesso em: 25 de maio.

SANTAMARÍA, C. et al. Antimicrobial activity of myotoxic phospholipases A2 from crotalid snake venoms and synthetic peptide variants derived from their C-terminal region. **Toxicon**, v. 45, n. 7, p. 807-15, Jun 2005. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15904676> >.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, n. 11, p. 1246-59, Nov 2006. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16973413> >.

SCREATON, G. et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 12, p. 745-59, Dec 2015. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26603900> >.

SHARP, T. M. et al. A New Look at an Old Disease: Recent Insights into the Global Epidemiology of Dengue. **Curr Epidemiol Rep**, v. 4, n. 1, p. 11-21, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28251039> >.

SIEUWERTS, A. M. et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-

values and cell survival. **Eur J Clin Chem Clin Biochem**, v. 33, n. 11, p. 813-23, Nov 1995. ISSN 0939-4974. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8620058> >.

SILVEIRA, L. B. et al. 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, Jan 2013. ISSN 1873-264X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22571953> >.

SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. Schlangengifte, III: mitteilung reinigung und crystallization des klapperschlangengiffes. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft** v. 71, p. 1076 -1081, 1938.

STOKES, A.; BAUER, J. H.; HUDSON, N. P. Experimental Transmission of Yellow Fever to Laboratory. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 8, n. 2, p. 103-164, 1928.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **J Mol Biol**, v. 189, n. 1, p. 113-30, May 1986. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3537305> >.

SWEET, B.; SABIN, A. Properties and antigenic relationships of hemagglutinins associated with the dengue viruses. **J Immunol**, v. 73, n. 5, p. 363-73, Nov 1954. ISSN 0022-1767. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13212058 >.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. **J Biotechnol**, v. 115, n. 2, p. 113-28, Jan 2005a. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607230> >.

_____. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli. **Microb Cell Fact**, v. 4, n. 1, p. 1, Jan 2005b. ISSN 1475-2859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15629064> >.

TAKEUCHI, H.; BABA, M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **J Virol Methods**, v. 33, n. 1-2, p. 61-71, Jun 1991. ISSN 0166-0934. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1658029> >.

TANAY, A. Chikungunya virus and autoimmunity. **Curr Opin Rheumatol**, v. 29, n. 4, p. 389-393, Jul 2017. ISSN 1531-6963. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28376065> >.

TJADEN, N. B. et al. Modelling the effects of global climate change on Chikungunya transmission in the 21(st) century. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 3813, Jun 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28630444> >.

TSUMOTO, K.; ARAKAWA, T.; CHEN, L. Step-wise refolding of recombinant proteins. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 11, n. 3, p. 285-8, Apr 2010. ISSN 1873-4316. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20210742> >.

TSUMOTO, K. et al. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. **Protein Expr Purif**, v. 28, n. 1, p. 1-8, Mar 2003. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12651100> >.

USME-CIRO, J. A. et al. The relevance of dengue virus genotypes surveillance at country level before vaccine approval. **Hum Vaccin Immunother**, v. 10, n. 9, p. 2674-8, 2014. ISSN 2164-554X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25483495> >.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1488, n. 1-2, p. 59-70, Oct 2000. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11080677> >.

VALLEJO, L. F.; RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. **Microb Cell Fact**, v. 3, n. 1, p. 11, Sep 2004. ISSN 1475-2859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15345063> >.

VAN MEER, G.; DE KROON, A. I. Lipid map of the mammalian cell. **J Cell Sci**, v. 124, n. Pt 1, p. 5-8, Jan 2011. ISSN 1477-9137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21172818> >.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M. J. S. M. Bioquímica de veneno de serpentes. In: BARRAVIEIRA, B. (Ed.). **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC Ltda, 1994. cap. 14, p.205 - 219.

WALL, S. B. et al. Oxidative modification of proteins: an emerging mechanism of cell signaling. **Front Physiol**, v. 3, p. 369, 2012. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23049513> >.

WARD, R. J. et al. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A2: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochem J**, v. 362, n. Pt 1, p. 89-96, Feb 2002a. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11829743> >.

WARD, R. J.; DE AZEVEDO, W. F.; ARNI, R. K. At the interface: crystal structures of phospholipases A2. **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1623-33, Nov 1998. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792179> >.

WARD, R. J. et al. Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys49-phospholipase A2 homologue, expressed as inclusion bodies in Escherichia coli. **Protein Expr Purif**, v. 21, n. 1, p. 134-40, Feb 2001. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11162398> >.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Res**, v. 85, n. 2, p. 328-45, Feb 2010. ISSN 1872-9096. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19857523> >.

WHO. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control** 2009.

_____. Dengue vaccine: WHO position paper – July 2016. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 91, n. 30, p. 349-64, Jul 2016a. ISSN 0049-8114. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27476189> >.

_____. **Yellow Fever** 2016b.

WILDER-SMITH, A. et al. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 3, p. e101-e106, Mar 2017. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28011234> >.

WRATHALL, D. P.; IZATT, R. M.; CHRISTENSEN, J. J. Thermodynamics of Proton Dissociation in Aqueous Solution. III. L-cysteine, and Mercaptoacetic Acid. Determination of Cysteine Microconstants from Calorimetric Data. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 86, n. 22, p. 4, 1964.

YAMAGUCHI, H.; MIYAZAKI, M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 235-51, 2014. ISSN 2218-273X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24970214> >.

YU, B. Z.; BERG, O. G.; JAIN, M. K. The divalent cation is obligatory for the binding of ligands to the catalytic site of secreted phospholipase A₂. **Biochemistry**, v. 32, n. 25, p. 6485-92, Jun 1993. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8518290> >.

ZAITSEVA, E. et al. Dengue virus ensures its fusion in late endosomes using compartment-specific lipids. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 10, p. e1001131, Oct 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20949067> >.

ZHANG, X. et al. Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 17, p. 6795-9, Apr 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23569243> >.

ZHANG, Y. et al. Expression, purification, and refolding of active human and mouse secreted group IIE phospholipase A₂. **Protein Expr Purif**, v. 80, n. 1, p. 68-73, Nov 2011. ISSN 1096-0279. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21605679> >.