

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
ERNESTO LOPES PINHEIRO JUNIOR

Caracterização estrutural, funcional e análise da resposta imune *in vivo* de uma serinoprotease recombinante de *Crotalus durissus collilineatus* modificada por PEGilação

Ribeirão Preto

2021

ERNESTO LOPES PINHEIRO JÚNIOR

Caracterização estrutural, funcional e análise da resposta imune *in vivo* de uma serinoprotease recombinante de *Crotalus durissus collilineatus* modificada por PEGilação

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga

Versão corrigida da tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 09/02/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Ribeirão Preto

2021

RESUMO

PINHEIRO-JÚNIOR, E. L. **Caracterização estrutural, funcional e análise da resposta imune in vivo de uma serinoprotease recombinante de *Crotalus durissus collilineatus* modificada por PEGlação.** 2020. 183 p. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

As serinoproteases de peçonhas de serpentes (SVSPs) são enzimas capazes de afetar o sistema hemostático humano, dada sua semelhança com enzimas presentes em suas diferentes vias. Assim, são consideradas promissores agentes terapêuticos, além de potenciais ferramentas biotecnológicas. A PEGlação, processo no qual há a conjugação de polietilenoglicol (PEG) às proteínas, busca reduzir a imunogenicidade e aumentar a drogabilidade destas biomoléculas *in vivo*. Neste contexto, este trabalho objetivou a purificação de uma SVSP (collineína-1) da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*, bem como a expressão da sua forma recombinante (rCollineína-1) na levedura *Pichia pastoris*. Ambas as proteínas foram PEGladas (PEG-collineína-1 e PEG-rCollineína-1) e as características estruturais e funcionais, além da avaliação da resposta imune, foram comparadas entre as quatro formas da enzima. A collineína-1 foi isolada da peçonha bruta através de dois passos cromatográficos em fase reversa, enquanto a rCollineína-1 foi purificada em três passos, em colunas de afinidade a íons metálicos imobilizados (IMAC) e troca catiônica. Em seguida, obteve-se uma população mono-PEGlada das proteínas. O modelo teórico da collineína-1 foi obtido utilizando a ferramenta SWISS-MODEL, revelando que a proteína possui estrutura semelhante a outras SVSPs. A análise de estabilidade térmica indicou que todas as formas da proteína apresentam temperaturas de desnovelamento semelhantes. O pH 5,0 foi a condição com menor temperatura de desnovelamento, enquanto o pH 7,0 se caracteriza como a melhor condição para a estabilidade de todas as formas avaliadas da enzima. Foi observado um aumento significativo no tamanho das proteínas após a PEGlação (collineína-1: $4,0 \pm 0,4$ nm, PEG-collineína-1: $9,9 \pm 1,1$ nm, rCollineína-1: $4,9 \pm 1,3$ nm; PEG-rCollineína-1: $10,7 \pm 1,3$ nm). Por outro lado, não foram visualizadas mudanças expressivas no conteúdo de estruturas secundárias das enzimas. O conteúdo de alfa-hélices (7%, 5%, 2%, 15%), folhas beta (31%, 31%, 31%, 22%), giros (21%, 19%, 16%, 17%) e elementos sem conformação definida (41%, 45%, 51%, 46%) para a collineína-1, PEG-collineína-1, rCollineína-1 e PEG-rCollineína-1, respectivamente, evidenciam que a PEGlação não alterou de maneira significativa a conformação espacial das proteínas. A determinação dos parâmetros cinéticos apontou valores de K_m semelhantes entre suas diferentes formas (collineína-1: $0,920 \pm 0,079$ mM; rCollineína-1: $1,243 \pm 0,113$ mM; PEG-collineína-1: $1,317 \pm 0,117$ mM e PEG-rCollineína-1: $1,4 \pm 0,119$ mM). No entanto, a constante catalítica (k_{cat}) e a constante de especificidade (k_{cat}/K_m) foram ligeiramente diferentes. A rCollineína-1 apresentou valores mais elevados destes parâmetros ($k_{cat}=2,934 \pm 0,118$ s⁻¹ e $k_{cat}/K_m = 2,4 \pm 0,115$ mM.s⁻¹) quando comparados à collineína-1 ($k_{cat}=0,497 \pm 0,017$ s⁻¹ e $k_{cat}/K_m=0,5 \pm 0,048$ mM.s⁻¹), PEG-collineína-1 ($k_{cat}=0,502 \pm 0,020$ s⁻¹ e $k_{cat}/K_m=0,4 \pm 0,068$ mM.s⁻¹) e PEG-rCollineína-1 ($k_{cat}=1,286 \pm 0,050$ s⁻¹ e $k_{cat}/K_m=0,9 \pm 0,084$ mM.s⁻¹). Estes resultados indicam que a PEGlação não foi prejudicial à atividade catalítica das formas nativa e recombinante, corroborando os resultados de degradação de fibrinogênio, os quais mostraram que todas as formas da enzima possuem atividade catalítica sobre esse substrato. Contudo, observou-se que a inibição do canal para potássio hEAG1 induzida pelas proteínas nativa e recombinante PEGladas foi significativamente menor que a inibição causada pelas enzimas não-PEGladas (45,5±13,4% para 8,2±4,7% e 50,3±6,0% para 5,7±3,7%, respectivamente, a 5 μM). Por outro lado, um aumento de atividade inibitória no hERG1 foi observado para a PEG-collineína-1 e PEG-rCollineína-1, com valores de IC₅₀ de 22,4±1,1 μM e de 10,0±0,4 μM, respectivamente. Outras serinoproteases foram testadas em hEAG1 e os resíduos de aminoácidos essenciais para a atividade destas enzimas neste canal foram propostos. A ausência de citotoxicidade em células PBMC e a inexistência de imunogenicidade *in vivo* avaliada em camundongos das proteínas PEGladas são resultados importantes na busca de uma aplicabilidade terapêutica. De maneira geral, a PEGlação destas proteínas direcionou sua atividade para o controle da homeostasia, ampliando as perspectivas de serem empregadas como agentes defibrinogênicos em condições patológicas como acidente vascular cerebral, trombose e embolia pulmonar.

Palavras-chave: SVSPs, expressão heteróloga, imunogenicidade, aplicabilidade terapêutica.

ABSTRACT

PINHEIRO-JÚNIOR, E. L. **Functional and structural characterization and immune response evaluation of a recombinant serine protease from *Crotalus durissus collilineatus* modified by PEGylation.** 2020. 183 p. PhD thesis. School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Snake venom serinoproteases (SVSPs) are enzymes capable of affecting the human hemostatic system, given their similarity with enzymes present in its different pathways. Thus, they are considered promising therapeutic agents, in addition to potential biotechnological tools. PEGylation, a process in which polyethylene glycol (PEG) is conjugated to proteins, aims to reduce the immunogenicity and to increase the drugability of these biomolecules *in vivo*. In this context, this work aimed the purification of an SVSP (collinein-1) from *Crotalus durissus collilineatus* venom, as well as the expression of its recombinant form (rCollinein-1) in *Pichia pastoris* system. Both proteins were PEGylated (PEG-collinein-1 and PEG-rCollinein-1) and the structural and functional characterization, in addition to the evaluation of the immune response, were compared between the four forms of the enzyme. Collinein-1 was isolated from the crude venom by two reversed-phase chromatographic steps, while rCollinein-1 was purified in three steps, in columns of affinity to immobilized metal ions (IMAC) and cation exchange. Then, a mono-PEGylated population of both proteins was obtained. The modelling of collinein-1 was obtained using the SWISS-MODEL tool, revealing that the protein has a structure like other SVSPs. The thermal stability analysis indicated that all forms of the protein have similar unfolding temperatures. PH 5.0 was the condition with the lowest unfolding temperature, while pH 7.0 was considered as the best condition for the stability of all forms of the enzyme. A significant increase in protein size was observed after PEGylation (collinein-1: 4.0 ± 0.4 nm, PEG-collinein-1: 9.9 ± 1.1 nm, rCollinein-1: 4.9 ± 1.3 nm; PEG-rCollinein-1: 10.7 ± 1.3 nm). On the other hand, no significant changes were seen in the content of secondary enzyme structures. The content of alpha-helices (7%, 5%, 2%, 15%), beta sheets (31%, 31%, 31%, 22%), turns (21%, 19%, 16%, 17%) and random coil elements (41%, 45%, 51%, 46%) for collinein-1, PEG-collinein-1, rCollinein-1 and PEG-rCollinein-1, respectively, showed that PEGylation did not interfere in the protein folding. The determination of kinetic parameters showed similar values of K_m between its different forms (collinein-1: 0.920 ± 0.079 mM; rCollinein-1: 1.243 ± 0.113 mM; PEG-collinein-1: 1.317 ± 0.117 mM and PEG-rCollinein-1: 1.4 ± 0.119 mM). However, the catalytic constant (k_{cat}) and the specificity constant (k_{cat}/K_m) were slightly different. rCollinein-1 showed higher values of these parameters ($k_{cat} = 2.934 \pm 0.118$ s⁻¹ and $k_{cat}/K_m = 2.4 \pm 0.115$ mM.s⁻¹) when compared to collinein-1 ($k_{cat} = 0.497 \pm 0.017$ s⁻¹ and $k_{cat}/K_m = 0.5 \pm 0.048$ mM.s⁻¹), PEG-collinein-1 ($k_{cat} = 0.502 \pm 0.020$ s⁻¹ and $k_{cat}/K_m = 0.4 \pm 0.068$ mM.s⁻¹) and PEG-rCollinein-1 ($k_{cat} = 1.286 \pm 0.050$ s⁻¹ and $k_{cat}/K_m = 0.9 \pm 0.084$ mM.s⁻¹). However, these results indicate that PEGylation was not harmful to the catalytic activity of native and recombinant forms, corroborating the results of fibrinogen degradation, which showed that all forms of the enzyme have catalytic activity on this substrate. However, it was observed that the inhibitory activity of PEGylated proteins was significantly lower in the hEAG1 channel ($45.5 \pm 13.4\%$ to $8.2 \pm 4.7\%$ and $50.3 \pm 6.0\%$ to $5.7 \pm 3.7\%$, at 5 μ M, for the native and recombinant proteins, respectively), while there was an increase in activity in hERG1, with IC₅₀ values of 22.4 ± 1.1 μ M and 10.0 ± 0.4 μ M for PEG-collinein-1 and PEG-rCollinein-1, respectively. Other serinoproteases were tested on hEAG1 and the essential amino acid residues for the activity of these enzymes in this channel have been proposed. The absence of cytotoxicity in PBMC cells and the lack of *in vivo* immunogenicity evaluated in mice of PEGylated proteins are important results in the quest for therapeutic applicability. Overall, the PEGylation of these proteins directed their activity towards hemostasis control, broadening their possibilities to be used as defibrinogenant agents in pathological conditions such as stroke, thrombosis, and pulmonary embolism.

Keywords: SVSPs, heterologous expression, immunogenicity, therapeutic applicability.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Espécies de serpentes do gênero *Crotalus* e suas principais toxinas

As espécies de serpentes peçonhentas, presentes na superfamília Colubroidea, são divididas em quatro famílias principais: Colubridae, Viperidae, Elapidae e Atractaspidae, com predominância de espécies da família Viperidae no território brasileiro (LAWSON et al., 2005). As peçonhas das espécies pertencentes a essas famílias refletem uma inovação marcante em relação às serpentes não peçonhentas, permitindo a transição de um mecanismo de caça mecânica – constrição, para um mecanismo químico – peçonha, viabilizando a captura de presas maiores que elas mesmas. Deste modo, a peçonha destes animais apresenta diversas proteínas com as mais variadas funções, que agem em sinergia, levando à imobilização, paralisação, digestão e morte de suas vítimas. Nas peçonhas de serpentes da família Viperidae, observa-se a presença de proteínas que interferem, principalmente, no sistema hemostático e reparo tecidual. Assim, o envenenamento em humanos é geralmente caracterizado por distúrbios na coagulação, hipofibrinogenemia, além de necrose no local da picada (SANZ et al., 2008).

A família Viperidae compreende, atualmente, três subfamílias: Azemiopinae, Viperinae e Crotalinae. Presente na subfamília Crotalinae, o gênero *Crotalus* apresenta pelo menos 29 espécies. No Brasil, encontra-se somente uma espécie desse gênero, denominada *Crotalus durissus* (Fig. 1), com a presença de seis subsespécies, sendo *C. d. ruruima*, *C. d. marajoensis*, *C. d. terrificus*, *C. d. cascavella*, *C. d. trigonicus* e *C. d. collilineatus* (OSHIMA-FRANCO Y, 1998; MURPHY, 2002; UETZ et al., 2016), embora as subespécies *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus* sejam as mais prevalentes (BOLDRINI-FRANCA et al., 2010).

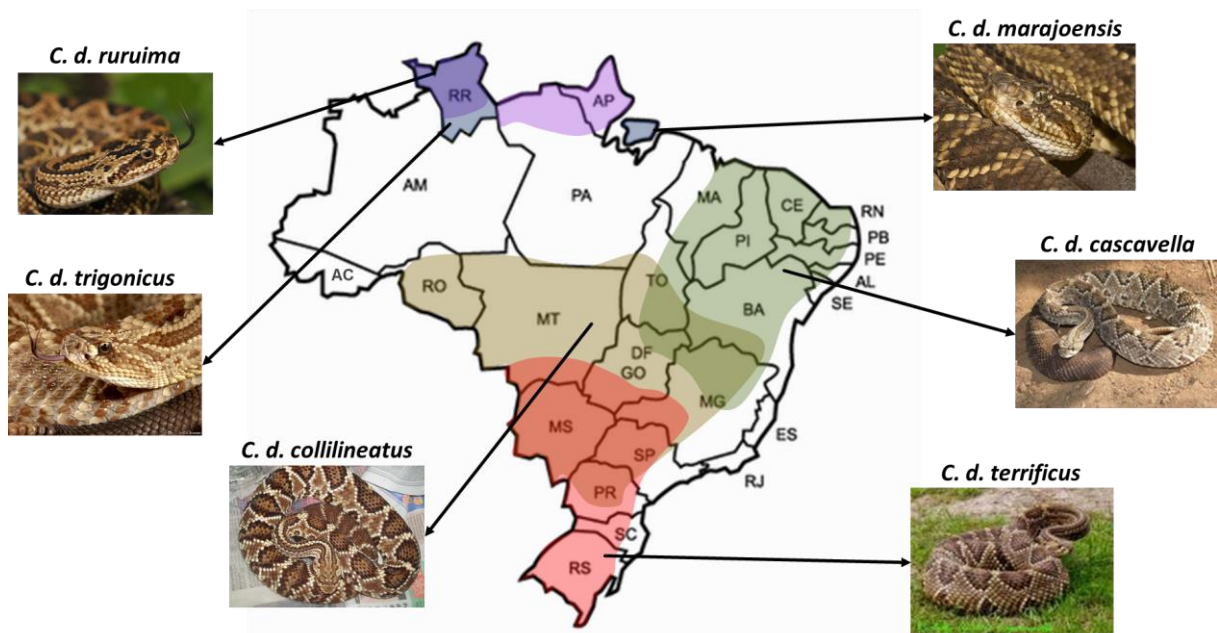


Figura 1. Distribuição das subespécies de *Crotalus durissus* no território brasileiro. Figura elaborada pelo autor, com base nos dados de Boldrini-França et al., 2010 e reptile-database.org.

Proporcionalmente, o acidente crotálico apresenta um grande índice de letalidade quando comparado àqueles ocasionados por outras serpentes peçonhentas no Brasil. A peçonha destes animais é conhecida pela capacidade de dissociar a transmissão neuromuscular, além de provocar sintomas miálgicos. A neurotoxicidade sistêmica é frequentemente acompanhada por rabdomiólise, causando necrose tubular aguda e falência renal, sendo a causa primária de morte decorrida das complicações do acidente crotálico (OSHIMA-FRANCO et al., 1999; CARDOSO, 2003).

A miotoxicidade e neurotoxicidade sistêmica são principalmente atribuídas à alta concentração da crotoxina. Esta é uma toxina heterodimérica, formada por uma fosfolipase do tipo A₂, que exibe β -neurotoxicidade pré-sináptica, bloqueando a transmissão neuromuscular através da redução da liberação de acetilcolina, e uma subunidade não enzimática, chamada de crotoxina A ou crotapotina, responsável por direcionar o complexo para uma ação no sistema nervoso (HABERMANN e BREITHAUPT, 1978; SAMPAIO et al., 2010). Esta toxina representa de 70 a 90% dos componentes presentes na peçonha de *Crotalus durissus* ssp. e é responsável por causar os principais sintomas do acidente crotálico (BON et al., 1989).

Além da crotoxina, a peçonha desta espécie apresenta três toxinas em proporções relevantes: (1) crotamina, uma toxina mionecrótica com conformação de β -defensina, agindo nos canais para sódio e potássio sensíveis à voltagem (CHANG e TSENG, 1978; PEIGNEUR et al., 2012), (2) giroxina, uma serinoprotease trombina-símile responsável por induzir uma

síndrome neurológica em camundongos, denominada síndrome de Barrel, e incoagulabilidade sanguínea (YONAMINE et al., 2012), e (3) convulxina, que pertence à classe das lectinas tipo-C e induz a agregação plaquetária e quadros convulsivos (FRANCISCHETTI et al., 1997). Entretanto, nos estudos de transcriptoma da glândula de *C. d. collilineatus*, realizados por Boldrini-França e colaboradores (2009; 2010), e estudos proteômicos efetuados por Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA et al., 2019) foram encontradas, em menores proporções, metaloproteases, fatores de crescimento, CRISP (*Cysteine-Rich Secretory Proteins*) desintegrinas, fator de crescimento neural, fosfodiesterases, fosfolipase B, entre outras toxinas (Fig. 2).

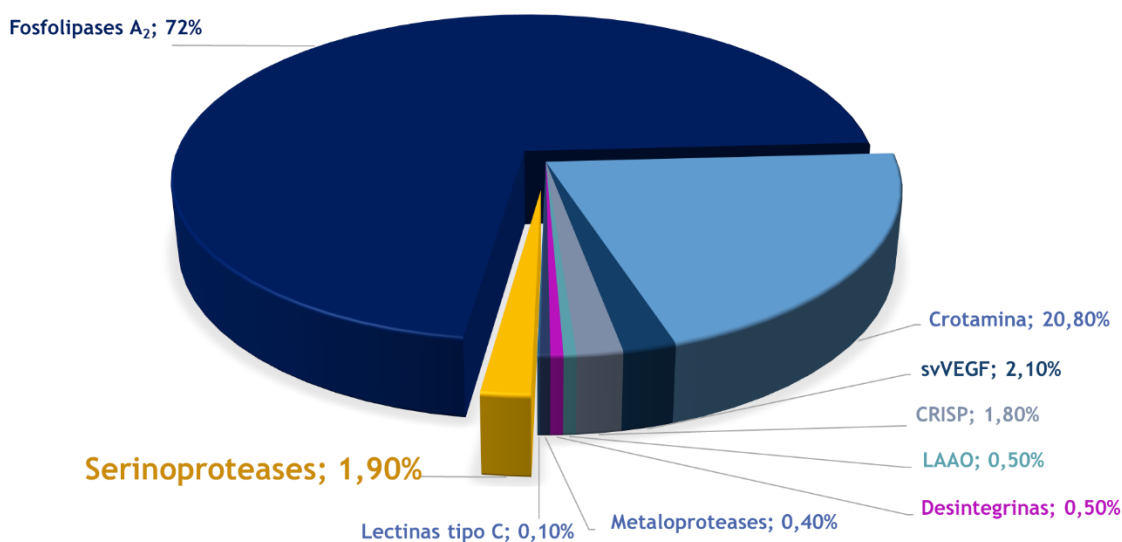


Figura 2. Proporção relativa de cada grupo de toxinas presente na peçonha de *C. d. collilineatus*. Figura elaborada pelo autor, com base nos dados de Boldrini-França et al., 2010.

1.2. Serinoproteases de peçonhas de serpentes e o sistema hemostático

A hemostasia é um componente crítico da preservação da estabilidade hemodinâmica. Assim, envolve não apenas a formação do coágulo sanguíneo, mas também sua decorrente dissolução. O ponto final do primeiro processo, que consiste na formação do coágulo de fibrina, pode ser alcançado através de duas vias distintas: intrínseca e extrínseca. Ambas as vias envolvem uma série de reações enzimáticas que terminam na formação de trombina, componente responsável por clivar o fibrinogênio em sua forma insolúvel, fibrina, além de ativar o fator XIII da coagulação, responsável por promover ligações cruzadas entre os monômeros de fibrina. As vias da coagulação são compostas por zimogênios de serinoproteases, nas quais enzimas funcionais ativam umas às outras. O coágulo sanguíneo,

formado no local de injúria e hemorragia, é composto pela deposição de fibrina, juntamente com as plaquetas, a fim de reparar a área danificada nos vasos sanguíneos (BRAUD et al., 2000; OVERBEY et al., 2014).

O fibrinogênio (fator I) é uma glicoproteína sintetizada pelo fígado, presente na circulação sanguínea dos vertebrados, participando do processo de formação de coágulos sanguíneos. Este fator consiste de um arranjo de dois pares de três cadeias polipeptídicas, denominadas α , β e γ , unidas entre si por 29 ligações dissulfeto (HALL e SLAYTER, 1959; JUNG et al., 2003; RIEDEL et al., 2011). É uma molécula solúvel, com massa molecular de aproximadamente 340 kDa. Estruturalmente, apresenta um caráter alongado, com dois nódulos principais, denominados D e E (Fig. 3). O nódulo central (E) contém as porções N-terminais das seis cadeias. Essas cadeias partem deste nódulo central em dois conjuntos de estruturas com três alfa-hélices, conduzindo ao nódulo distal (D). Cada nódulo D contém as porções C-terminais, com enovelamentos independentes, das cadeias $B\beta$ e γ , denominadas βC e γC , respectivamente. A porção C-terminal das cadeias $A\alpha$, denominada αC , deixa o nódulo D, com uma curta distância, como uma quarta cadeia, e se estende ao longo da superfície da proteína, em direção ao nódulo central (LORD, 2007).

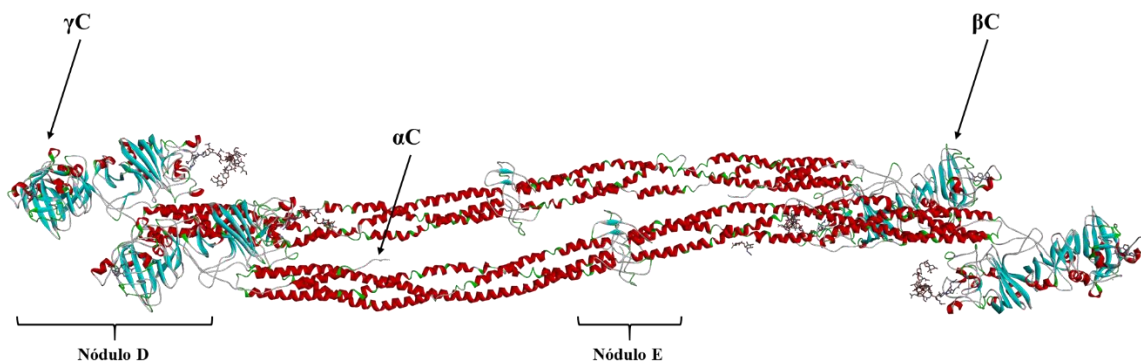


Figura 3. Estrutura tridimensional do fibrinogênio humano. Estrutura cristalográfica renderizada utilizando programa Discovery Studio 4.1 (Accelrys®). Código PDB: 3GHG. Imagem elaborada pelo autor.

A conversão de fibrinogênio em fibrina ocorre pela clivagem das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ pela trombina, liberando os fibrinopeptídeos A (FpA) e B (FpB), respectivamente. A remoção destes fibrinopeptídeos expõe os sítios de polimerização das porções N-terminais das cadeias α e β , chamados de botões 'A' e 'B'. As novas porções N-terminais interagem com sítios de polimerização, denominados de cavidades 'a' e 'b' nas porções γC e βC , formando as interações 'A:a' e 'B:b'. Em seguida, a polimerização ocorre em duas etapas: **(1)** formação de protofibrilos

de cadeia dupla e (2) agregação lateral de protofibrilos em fibras (Fig. 4). As interações ‘A:a’ auxiliam na formação dos protofibrilos, enquanto ‘B:b’ influenciam na agregação lateral destas cadeias. A trombina também catalisa a ativação do fator XIII (fator XIII → fator XIIIa), o qual catalisa a formação de ligações isopeptídicas entre as cadeias γ de duas moléculas de fibrina, formando dímero γ - γ , e entre as cadeias α , originando α -polímeros. Estes polímeros de ligações cruzadas são mais resistentes à fibrinólise do que aqueles que não as possuem (LORD, 2007).

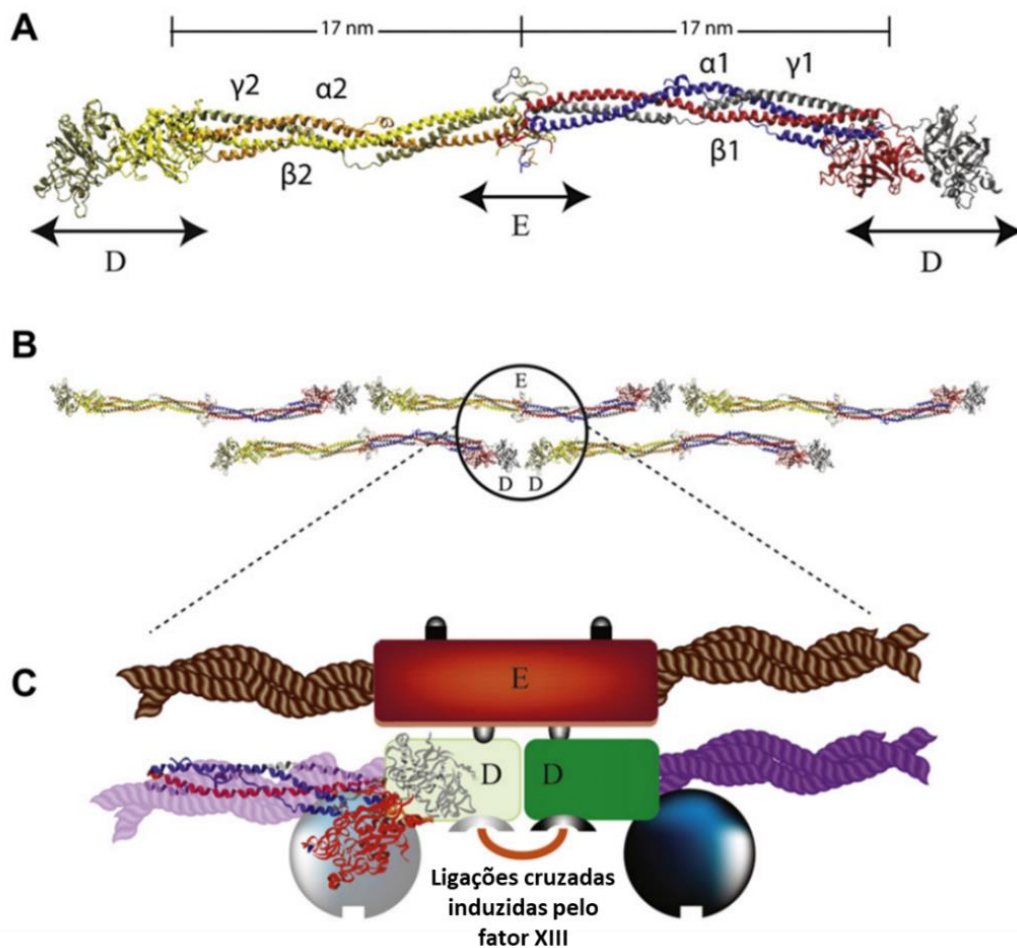


Figura 4. Estrutura e interações entre moléculas de fibrinogênio para formação do coágulo de fibrina. (A) Estrutura cristalográfica do fibrinogênio (código PDB: 1M1J), mostrando a região central E, conectada às regiões distais D pelas estruturas denominadas $\alpha_1\beta_1\gamma_1$ e $\alpha_2\beta_2\gamma_2$. (B) e (C) Diagrama esquemático de um protofibril de fibrina mostrando em (B) a configuração em cadeia dupla semi-escalonada e em (C) as interações trimodulares entre as regiões E central e D distal, destacando as ligações cruzadas induzidas pelo fator XIII. Adaptado de LIM et al., 2008.

O fibrinogênio e a fibrina fornecem a estrutura de suporte necessária para que o processo de coagulação sanguínea ocorra. Na fase inicial de formação do coágulo, o fibrinogênio atua

como uma molécula suporte, mediando a agregação plaquetária. Subsequentemente, o fibrinogênio é convertido à uma matriz de fibrina, dando forma, consistência, flexibilidade e estabilidade ao coágulo formado (LORD, 2007).

Diversas toxinas presentes em peçonhas de serpentes possuem o sistema hemostático como alvo, como as metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases do tipo A₂, ADPases, 5'-nucleotidases e L-aminoácido oxidases (KINI, 2011). Estas proteínas apresentam mecanismos de ação distintos, podendo ativar, inibir ou modular a atividade de diversos componentes presentes neste sistema (Fig. 5).

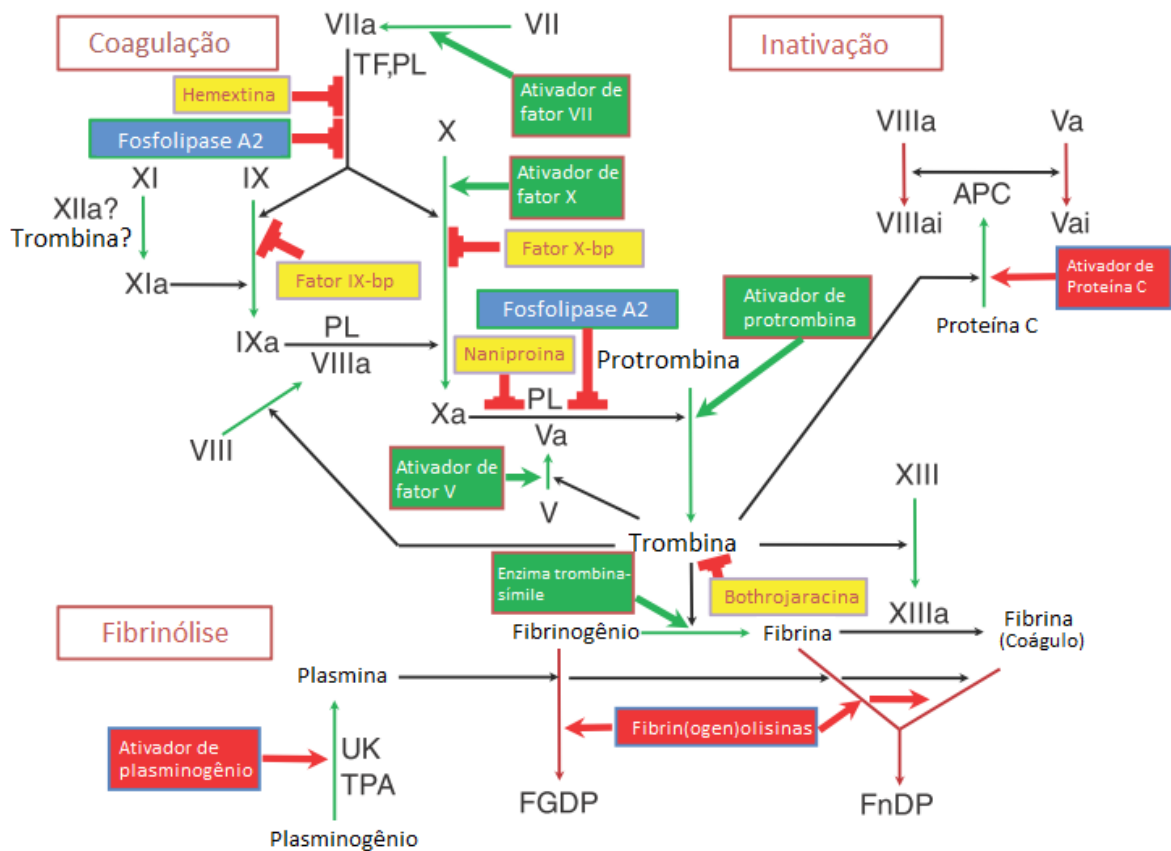


Figura 5: Toxinas de serpentes com ação sobre o sistema hemostático. As proteases agem através da clivagem de fatores específicos (setas em vermelho), enquanto outras toxinas agem através de interações com os componentes deste sistema (blocos vermelhos). As caixas em verde indicam proteases pró-coagulantes. As caixas vermelhas referem-se às proteases anticoagulantes e proteases que afetam a fibrinólise. Caixas azuis indicam fosfolipases A₂, enquanto as caixas amarelas indicam proteínas sem ação enzimática. Adaptado de KINI (2011).

As peçonhas de serpentes das subfamílias Viperinae e Crotalinae possuem um grande número de proteínas e peptídeos que apresentam a capacidade de afetar o sistema hemostático de suas presas. Estes compostos são classificados como coagulantes, anticoagulantes ou fatores

fibrinolíticos. O quadro de envenenamento por estas serpentes muitas vezes resulta em hemorragia persistente, uma vez que os componentes da peçonha causam depleção acentuada de fibrinogênio e outros fatores de coagulação, impedindo a formação do coágulo sanguíneo (BRAUD et al., 2000; SERRANO e MAROUN, 2005).

As serinoproteases de peçonhas de serpentes (SVSPs – *Snake Venom Serine Proteases*) pertencem a um grupo de proteínas chamadas peptidases, consistindo em uma das principais classes de proteínas que atuam no sistema hemostático durante o quadro de envenenamento. No geral, as SVSPs afetam as vias presentes nos mecanismos de controle da hemostasia, ativando ou inativando, especificamente, componentes do sangue envolvidos na coagulação, fibrinólise, agregação plaquetária e sistema calicreína-cinina (HALFON e CRAIK, 1998; SERRANO e MAROUN, 2005).

Com relação ao seu sítio ativo, as SVSPs possuem a tríade catalítica similar a todas as serinoproteases (Fig. 6), e a numeração dos resíduos do sítio catalítico foi determinada de acordo com a sequência de aminoácidos da tripsina. O resíduo de serina, na posição 195, atua como nucleófilo, a histidina 57 tem o papel de aceptor/doador de prótons, enquanto a asparagina 102 age como indutor eletronegativo (PRADNIWAT e ROJNUCKARIN, 2014). A reação, ilustrada na figura 6, apresenta oito passos: **(1)** abstração do próton da cadeia lateral do resíduo de serina, ocasionando em um ataque nucleofílico à ligação peptídica do substrato; **(2)** formação do intermediário tetraédrico; **(3)** formação de acil-enzima; **(4)** remoção do componente amina da enzima (metabolizado pelo organismo) e ligação à serina, completando o primeiro estágio (acilação da enzima), resultando no primeiro produto da reação; **(5)** uma molécula de água é adicionada no local onde estava a região N-terminal. A histidina desprotona a água para formar um ânion hidróxido, o qual ataca o carbono do lado carboxi e desestabiliza o intermediário acil; **(6)** uma molécula de água é desprotonada por catálise ácido-base, gerando um íon de hidróxido fortemente nucleofílico, que ataca a ligação éster da acilenzima, gerando um segundo intermediário tetraédrico; **(7)** e **(8)** representam o rearranjo molecular do segundo produto, causando sua liberação e reconstrução do sítio ativo da enzima (BERG et al., 2002).

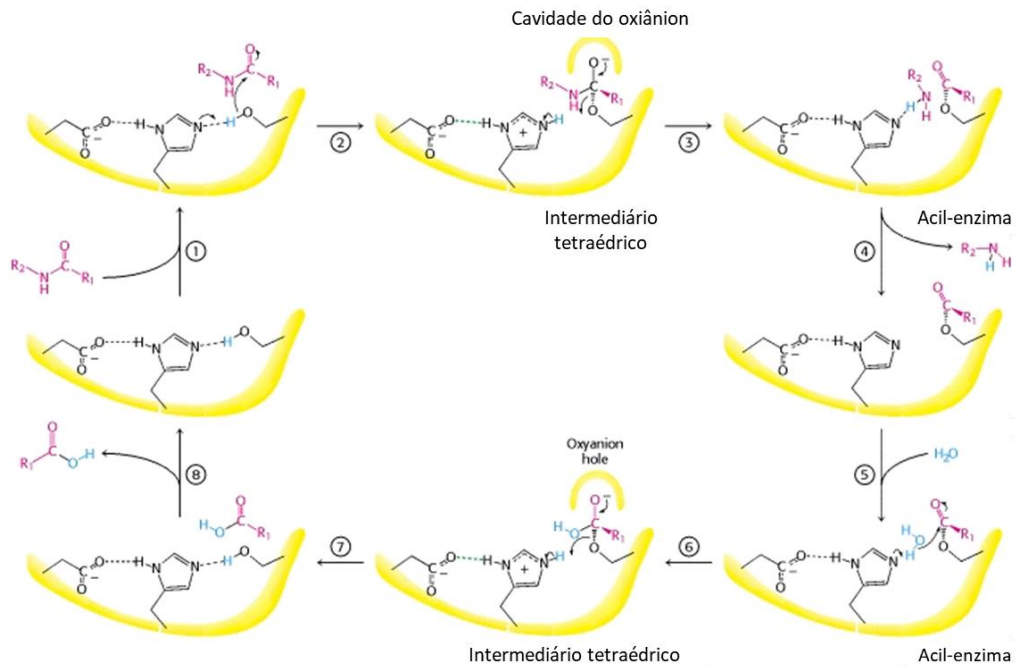


Figura 6. Mecanismo de ação das serinoproteases, ilustrando os oito passos do mecanismo de catálise. Adaptado de BERG et al., 2002.

As enzimas trombina-símile (TLEs – *Thrombin-like enzymes*) são serinoproteases presentes em peçonhas de serpentes e possuem atividade proteolítica sobre o fibrinogênio. Similar à produção de fibrina pela trombina endógena, as TLEs liberam fibrinopeptídeos pela clivagem da ligação Arg-Lys nas cadeias α e β do fibrinogênio. Entretanto, enquanto a trombina é capaz de clivar o fibrinogênio em ambas as cadeias, liberando tanto o fibrinopeptídeo A, quanto fibrinopeptídeo B, as TLEs clivam, preferencialmente, apenas uma destas cadeias (PRADNIWAT e ROJNUCKARIN, 2014).

De acordo com a ação seletiva destas enzimas nas cadeias α e β , as TLEs podem ser classificadas em três classes: A, agindo preferencialmente sobre a cadeia α ; B, atuando preferencialmente na cadeia β ; ou AB, agindo indistintamente nas duas cadeias. A maioria das TLEs de peçonhas de serpente é classificada na classe A. Contudo, uma TLE pertencente à classe B foi encontrada na peçonha de *Agkistrodon contortrix contortrix*, denominada contortrixobina (AMICONI et al., 2000). TLEs da classe AB também foram purificadas da peçonha de *A. bilineatus* (KOMORI et al., 1993) e *A. blomhoffii brevicaudus* (LEE et al., 1999).

Todavia, a grande maioria das TLEs não é capaz de ativar o Fator XIII, responsável por formar as ligações cruzadas entre os monômeros de fibrina. Desta maneira, origina-se apenas um coágulo frouxo, facilmente degradado pelo sistema fibrinolítico do organismo (MACKESSY, 2010; PRADNIWAT e ROJNUCKARIN, 2014). Dadas estas características

únicas, as TLEs possuem potencial para serem aplicadas como agentes terapêuticos em distúrbios trombóticos, como trombose de vasos profundos ou acidente vascular encefálico isquêmico, além de outras possíveis aplicações (Fig. 7).

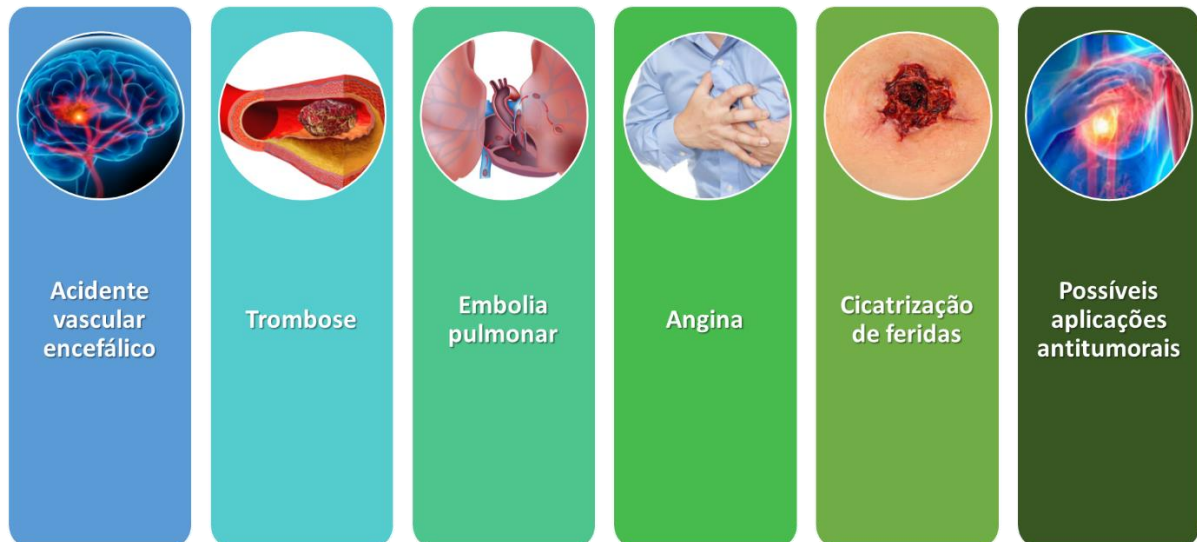


Figura 7. Possíveis aplicações terapêuticas das TLEs. Imagem elaborada pelo autor.

1.3.Toxinas animais e canais iônicos

Os canais iônicos desempenham funções cruciais na geração de potenciais de ação e, conseqüentemente, em outras atividades celulares, como transdução de sinal, liberação de neurotransmissores, contração muscular, secreção de hormônios, mobilidade celular e apoptose (KIM, 2014; IMBRICI et al., 2016). Tais estruturas constituem o terceiro maior grupo de moléculas de sinalização codificadas pelo genoma humano (WULFF et al., 2009). Neste contexto, houve um aumento expressivo envolvendo o estudo destas proteínas e seus respectivos mecanismos, sendo que grande parte do conhecimento adquirido, envolvendo a identificação, caracterização estrutural e funcional, bem como sua distribuição nos organismos, foi feita com o auxílio de neurotoxinas. Além disso, o uso dessas toxinas também contribuiu na caracterização de canais iônicos envolvidos em processos fisiopatológicos, como câncer, doenças autoimunes, mal de Parkinson e Alzheimer, esclerose múltipla, entre outros (IMBRICI et al., 2016; CARBONE e MORI, 2020).

O fenômeno da excitabilidade elétrica é uma das propriedades mais significativas e inatas dos neurônios. Como a maioria das células eucarióticas, os neurônios mantêm um gradiente iônico em sua membrana, de modo que o líquido intracelular contenha uma alta

concentração de íons de potássio e baixa concentração de íons de sódio e cálcio em relação ao líquido extracelular. Esses gradientes são mantidos pela ação de bombas de íons dependentes de ATP, específicas para Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , que permitem a passagem de íons específicos e, portanto, carga elétrica (CATTERALL, 1984; JENTSCH et al., 2004).

Assim como outros tipos de proteínas, os canais iônicos apresentam partes móveis que executam funções diferentes. Primariamente, essas proteínas possuem um poro aquoso e seletivo de íons que atravessa a membrana plasmática. Existem diferentes mecanismos para abrir, fechar ou inativar este poro, em resposta a diferentes estímulos biológicos, como alteração na tensão da membrana, interação de um ligante ou modificações pós-traducionais, como a fosforilação (YELLEN, 1998; JENTSCH et al., 2004). Essas mudanças permitem a rápida entrada ou saída de íons específicos em favor de seu gradiente eletroquímico, resultando na hiperpolarização ou despolarização da membrana (CATTERALL, 1984). A capacidade de modulação de canais específicos por determinados tipos de toxinas animais despertou grande interesse científico, visando a caracterização dessas proteínas, uma vez que elas podem ser consideradas como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos com potencial uso terapêutico (LEWIS e GARCIA, 2003; WULFF et al., 2009; COLOGNA et al., 2012).

Neste contexto, toxinas animais desempenharam um papel importante no estudo de canais iônicos, desde o início dos trabalhos sobre os princípios básicos que regem seu funcionamento (KOZLOV, 2017). Tipicamente, as toxinas podem interferir no funcionamento de canais iônicos dependentes de voltagem através de dois mecanismos distintos: **(1)** bloqueio da região do poro do canal, inibindo o fluxo de íons por ligação à parte externa ou no interior do poro condutor de íons; **(2)** modulação de abertura do poro, interagindo em um sítio específico da estrutura, alterando sua conformação durante a abertura ou inativação (KALIA et al., 2015).

Grande parte do conhecimento gerado sobre as propriedades de canais iônicos em membranas plasmáticas foram obtidos utilizando a técnica de “*voltage clamp*”. Em termos gerais, este método permite a leitura do fluxo de íons em uma membrana na forma de corrente elétrica, enquanto o potencial da membrana é mantido sob controle experimental com um amplificador de realimentação. Este método foi primeiramente desenvolvido por Cole (COLE, 1949) e Hodgking e colaboradores (HODGKIN et al., 1952), para uso em axônio gigante de lulas. Desde então, diferentes desdobramentos desta técnica foram desenvolvidos e a sua aplicação foi estendida para uma grande gama de tecidos e culturas celulares.

1.3.1. Canais para sódio dependentes de voltagem

Os canais para sódio dependentes voltagem (Navs) foram descobertos por Hodgkin e Huxley em 1952, durante estudos a condução elétrica em axônios de lulas gigantes (HODGKIN e HUXLEY, 1952). Tais estruturas compreendem proteínas transmembrana responsáveis pelo aumento, dependente de voltagem, na permeabilidade do sódio celular, iniciando potenciais de ação em células excitáveis (CLAIRFEUILLE et al., 2016; CARNEVALE e KLEIN, 2017). Seu papel na transmissão de impulsos nervosos é tão importante que seu aparecimento é considerado como um dos fatores-chave que sustentaram o desenvolvimento do sistema nervoso (KASIMOVA et al., 2016). Até o momento, nove isoformas destes canais foram identificadas em células de mamíferos, nomeadas de Nav1.1 a Nav1.9, apresentando mais de 50% de identidade entre suas sequências de aminoácidos. Recentemente, foi descoberta uma nova família de canais, denominada Nav2. Entretanto, pouco se sabe, até o momento, sobre suas funções no organismo (WATANABE et al., 2000; FUX et al., 2018).

As isoformas de Nav são diferenciadas pela sua localização no sistema nervoso e também pelos seus padrões de expressão em diferentes tecidos (GOLDIN, 2001; LUIZ e WOOD, 2016; ZAKLYAZMINSKAYA e DZEMESHKEVICH, 2016). As isoformas Nav1.1, 1.2 e 1.3 são expressas no sistema nervoso central (SNC), enquanto Nav1.4 e 1.5 são abundantes na musculatura cardíaca e esquelética, respectivamente. A isoforma Nav1.6 é expressa no SNC e no sistema nervoso periférico (SNP), ao passo que Nav1.7, 1.8 e 1.9 tem sua expressão majoritariamente restrita no SNP (DE LERA RUIZ e KRAUS, 2015).

Além de sua presença em células excitáveis, vários subtipos de Navs são expressos em células não excitáveis, como macrófagos, células cancerígenas, astrócitos e microglia. Eles podem desempenhar papéis diferentes nestes tipos de células, como a regulação de sua motilidade, liberação de moléculas bioativas, atividade de Na^+/K^+ -ATPase, fagocitose e atividade metastática (DEUIS et al., 2017). Deste modo, essas características os transformam em importantes alvos moleculares, buscando o desenvolvimento de novas terapias para controlar determinadas condições patológicas (LIU et al., 2019).

Estruturalmente, os Navs consistem em um poro aquoso, formado por uma subunidade alfa, com aproximadamente 250 kDa, que pode ser associada a subunidades beta auxiliares ($\beta 1$, $\beta 2$ ou $\beta 3$) (CATTERALL, 2000). A subunidade alfa é composta por quatro domínios homólogos ligados covalentemente (I-IV), com seis segmentos transmembrana cada (S1-S6).

O segmento S4 é carregado positivamente, apresentando resíduos de lisina, arginina e histidina, atuando como um sensor de tensão para a ativação do canal (Fig. 8). A inativação é mediada por uma alça intracelular que conecta os domínios III e IV (CESTELE e CATTERALL, 2000). São conhecidos seis sítios diferentes que atuam como receptores nestas estruturas. As interações de toxinas com estes sítios específicos podem causar alterações importantes nas funções desempenhadas por esses canais em determinado processo fisiológico (STEVENS et al., 2011).

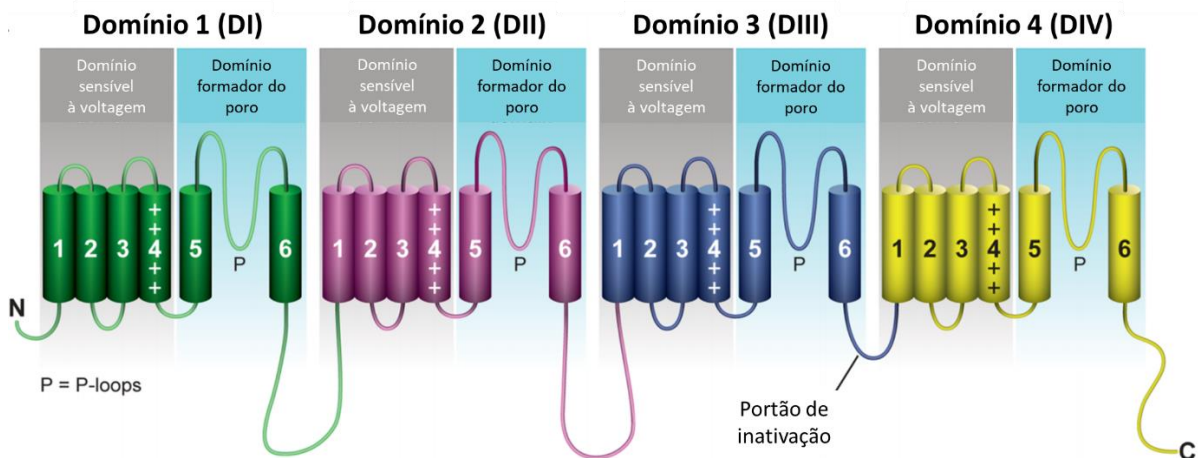


Figura 8. Topologia das subunidades α do canal Nav humano. Essas proteínas consistem em quatro domínios homólogos DI (verde), DII (rosa), DIII (azul) e DIV (amarelo) conectados por alças intracelulares. Cada domínio contém seis segmentos helicoidais transmembranares (S1–S6). Os segmentos S1-S4 formam o domínio sensível à voltagem (VSD, *voltage sensor domain*). Os sinais positivos em S4 representam o domínio sensível à voltagem com carga positiva (contendo resíduos de lisina, arginina e histidina). O movimento do segmento S6 leva à abertura do canal em resposta à despolarização da membrana. Os segmentos S5, S6 e os poros-loops de conexão (loops-P) formam o poro do canal. O *loop* intracelular que liga DIIIS6 e DIVS1 funciona como uma porta de inativação, fechando o poro do canal durante a inativação rápida. Adaptado de Ruiz e Kraus (2015).

Os canais para sódio dependentes de voltagem são alvos moleculares para uma ampla gama de neurotoxinas, como a tetrodotoxina (TTX), saxitoxina (STX) e batracotoxina (BTX), assim como peptídeos isolados das peçonhas de escorpiões, aranhas, anêmonas do mar e caracóis. Essas toxinas interagem com pelo menos seis sítios já caracterizados em canais iônicos, denominados de 1 a 6, e podem inibir diretamente o poro do canal ou modular os seus mecanismos de abertura e fechamento (CESTELE e CATTERALL, 2000).

O alto grau de homologia entre as sequências de aminoácidos das diferentes isoformas de Navs dificulta o processo de busca de ligantes que sejam seletivos para um subtipo específico. Todos os subtipos de Navs caracterizados até o momento podem ser classificados

quanto à sua sensibilidade à neurotoxina TTX. As isoformas Nav1.1-1.4, Nav1.6 e Nav1.7 são inibidas por concentrações na faixa de nanomolar de TTX, sendo classificadas como sensíveis à TTX. Por outro lado, as isoformas Nav1.5, Nav1.8 e Nav1.9 são inibidas por concentrações na faixa de micromolar de TTX, classificadas, assim, como resistentes à TTX (DE LERA RUIZ e KRAUS, 2015).

Devido a extensas pesquisas e descobertas importantes no contexto dos Navs, compreendendo sua caracterização estrutural e funcional, sabe-se que estas estruturas estão envolvidas em uma variedade de distúrbios e patologias, como dor, desordens neuromusculares, epilepsia, doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, disfunção cognitiva, entre outros (CATTERALL et al., 2020). Notavelmente, processos patofisiológicos ligados à dor emergiram como uma indicação terapêutica promissora para os inibidores de Navs, com destaque para o Nav1.7 para o tratamento de dor crônica (GASKIN e RICHARD, 2012; WULFF et al., 2019). Entretanto, são necessários grandes investimentos na área de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos seletivos para determinadas isoformas destas estruturas, a fim de desenvolver terapias inovadoras para doenças e distúrbios específicos.

1.3.2. Canais para potássio dependentes de voltagem

O fluxo de íons de potássio (K^+) através de membranas celulares é um processo fisiológico essencial para diversas funções biológicas, como regulação da pressão arterial, imunidade, liberação de neurotransmissores e condução nervosa, contração muscular, secreção de hormônios, regulação do volume intracelular, crescimento e diferenciação celular, entre outros (MOUHAT et al., 2008; WULFF et al., 2009). Atualmente, sabe-se que o genoma humano codifica aproximadamente 40 genes de canais para potássio dependentes de voltagem (Kvs). Desta maneira, estes canais tornam-se alvos interessantes para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de diversos distúrbios, como câncer, doenças autoimunes, além de anomalias metabólicas, neurológicas e cardiovasculares (NORTON e CHANDY, 2017).

Esses canais são distribuídos em 12 subfamílias, denominadas Kv1 a Kv12, de acordo com a homologia de sua sequência de aminoácidos (GUTMAN et al., 2005). Essas subfamílias compartilham similaridades estruturais, apresentando tetrâmetros de subunidades alfa, que se juntam para formar complexos homo ou heterodiméricos. Cada subunidade alfa apresenta seis

segmentos transmembrana, denominados S1 a S6, e uma alça altamente conservada (P), situada entre os segmentos S5 e S6 (CATTERALL et al., 2007).

Todos esses canais estão distribuídos ao longo do organismo humano, variando sua expressão de acordo com sua localização. Membros da família dos canais Kv1.x (*Shaker*) são encontrados no cérebro (Kv1.1-1.4, Kv1.6 e Kv1.8), sistema nervoso (Kv1.1, Kv1.2 e Kv1.4-1.8), músculo esquelético (Kv1.1, Kv1.4, Kv1.7 e Kv1.8), musculatura lisa (Kv1.2 e Kv1.5), pâncreas (Kv1.1-1.3), pulmão (Kv1.3-1.7), placenta (Kv1.7), rim (Kv1.5 e Kv1.8), retina (Kv1.1 e Kv1.2), cólon (Kv1.5 e Kv1.6), assim como células hematopoiéticas, linfócitos e osteoclastos (Kv1.3) (HUMPHRIES e DART, 2015).

A família *Shab* compreende os Kv2.1 e Kv2.2, presentes no cérebro, coração, rim, musculatura esquelética, pulmão, retina e pâncreas. A família *Shaw* é composta pelos Kv3.1-3.4. Todas as isoformas desta família são encontradas no cérebro, embora algumas também estejam presentes na musculatura esquelética (Kv3.1 e Kv3.4), pâncreas (Kv3.2 e Kv3.4), fígado (Kv3.3), baço e linfócitos (Kv3.1) (RUDY e MCBAIN, 2001). A família *Shal*, representada pelos canais Kv4.1-4.3, é essencialmente encontrada no cérebro, coração, musculatura lisa e neurônios. Os canais do tipo KQT compreendem os Kv7.1-7.5. São majoritariamente encontrados no coração, pâncreas, sistema auditivo, rim, pulmão, cólon e placenta (Kv7.1), gânglios simpáticos e cérebro (Kv7.2) e cérebro, testículos e olhos (Kv7.3). O Kv7.4 é encontrado no sistema auditivo, enquanto o Kv7.5 é expresso no cérebro, gânglios simpáticos e musculatura esquelética (MOUHAT et al., 2008). Por fim, temos a família EAG (*ether-a-go-go*), composta pelos Kv10.x, Kv11.x e Kv12.x, discutidos em detalhes no item 1.3.3.

Canais para potássio desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento de diversas patologias humanas. Mutações em genes que codificam tais estruturas levam a distúrbios no SNC e SNP, sistema cardíaco, imune, circulatório, etc. (TIAN et al., 2014). Pesquisas recentes relacionam diversas patologias com o mal funcionamento destas estruturas, como ataxias episódicas, convulsões no período neonatal, doença de Alzheimer e Parkinson, síndrome de QT longo congênita, diabetes tipo II, entre outros (SHIEH et al., 2000).

Em termos de caracterização funcional, esses canais apresentam dois domínios distintos: **(1)** um sítio sensível à voltagem, compreendendo os segmentos transmembrana S1 a S4, o qual contém aminoácidos carregados positivamente e **(2)** um sítio condutor do poro, formado pelos segmentos S5 e S6, além do *loop* P (Fig. 9) (CATTERALL, 1995; CHOE, 2002). O modelo proposto para elucidar os mecanismos de abertura e fechamento destes canais considera que o

domínio C-terminal do segmento S3 e o segmento S4 formam um arranjo “*paddle-like*”, responsável pelos movimentos de abertura e fechamento destas estruturas (DOYLE et al., 1998).

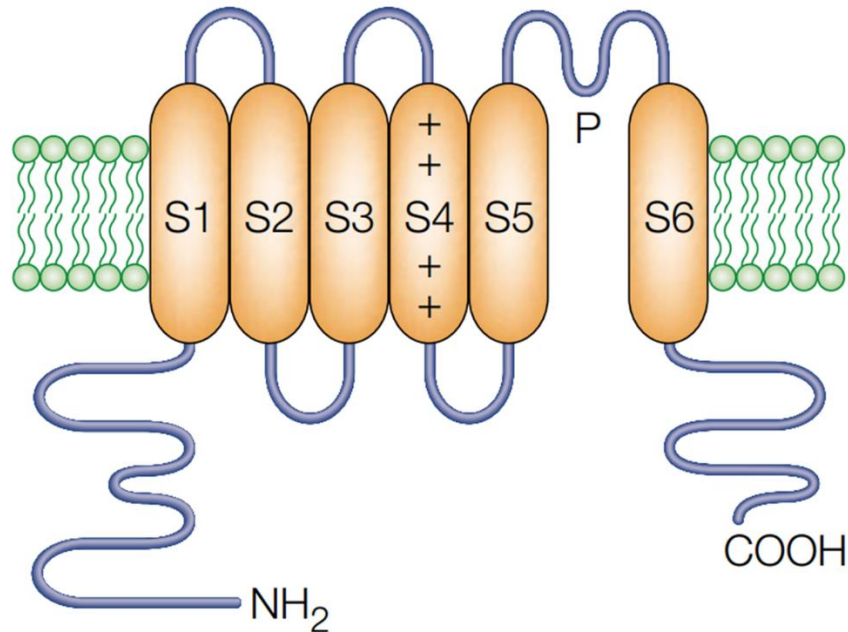


Figura 9. Estrutura genérica de um canal para potássio sensível à voltagem. As estruturas marcadas em laranja demonstram o domínio transmembrana da proteína, enquanto os segmentos em azul ilustram outras regiões do canal iônico. Os sinais positivos em S4 representam o domínio sensível à voltagem com carga positiva. Reproduzido de Choe, 2002.

Os canais para potássio são altamente permeáveis a esses íons devido ao filtro de seletividade presente na região do poro. Esta é a parte mais estreita do canal e possui uma sequência de aminoácidos altamente conservada: TVGYGD (BERNECHE e ROUX, 2005). Os íons de potássio só podem passar por esse filtro quando liberam moléculas de água da sua camada de solvatação, o que resulta em perda de energia. Os íons compensam essa perda energética ligando-se aos grupos carbonila da tirosina e glicina presentes no filtro de seletividade (Fig. 10). Somente no momento em que essa interação compensa a perda de energia que ocorreu quando as moléculas de água foram removidas, o íon potássio passa através do canal (KUANG et al., 2015).

O raio de um íon sódio apresenta menor tamanho quando comparado a um íon de potássio. Devido ao tamanho menor, a interação entre o sódio e o filtro de seletividade é menos favorecida (Fig. 10), não compensando a energia perdida pela liberação das moléculas de água (KUANG et al., 2015). Conseqüentemente, não é vantajoso energeticamente que um íon de

sódio passe através de um canal para potássio. Isso torna o canal de potássio 10.000 vezes mais permeável para os íons K^+ do que para os íons Na^+ (BERNECHE e ROUX, 2005).

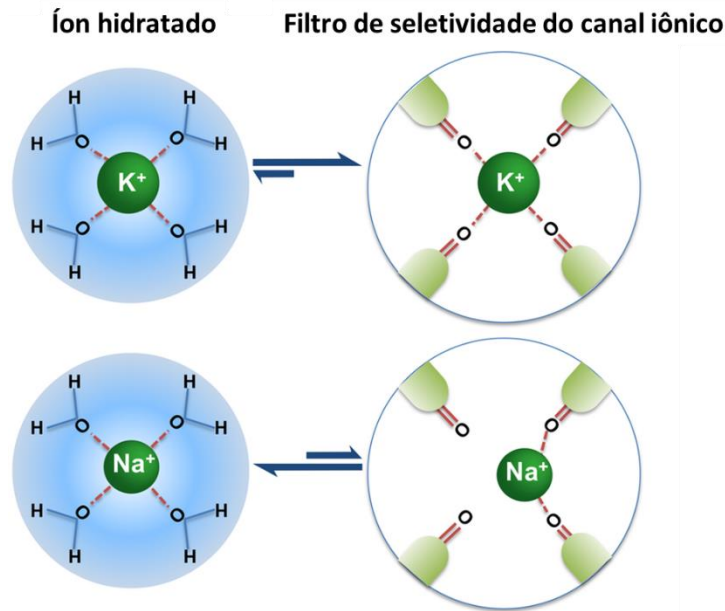


Figura 10. Interação dos íons potássio e sódio com grupos carbonila ou carboxila no filtro de seletividade de um canal para potássio. Devido ao tamanho menor do íon sódio, a interação é subótima, o que torna o canal mais permeável aos íons potássio. Adaptado de Stravos et al. (2014).

Após os íons potássio se ligarem aos grupos carbonila no filtro de seletividade, eles precisam se dissociar desse local de ligação para que possam atravessar o canal. Essa dissociação ocorre pois os íons potássio começam a se repelir, através de forças eletrostáticas. Existem três locais de ligação para íons potássio no poro, localizados próximos um do outro. Devido à repulsão eletrostática, os íons deixam seu local de ligação e passam pela região dos poros (BERNECHE e ROUX, 2005).

Toxinas capazes de agir em Kvs geralmente se ligam na região do poro ou no domínio sensível à voltagem. As toxinas bloqueadoras e moduladoras de canais para potássio tiveram um importante papel no estudo destas estruturas, uma vez que permitiram a identificação e caracterização de novas subclasses de canais, além de auxiliarem no estudo da estequiometria das subunidades que formam tais estruturas (KALIA et al., 2015). A maioria das toxinas conhecidas atuantes nos canais para potássio dependentes de voltagem é encontrada nas peçonhas de escorpiões, aranhas e anêmonas. Por outro lado, as toxinas de peçonhas de serpente ainda são pouco estudadas quanto ao seu potencial de ação em canais iônicos.

1.3.3. Collineina-1 e o canal para potássio hEAG1

A família de canais para potássio dependentes de voltagem denominada *ether-à-go-go* compreende as subfamílias EAG (Kv10), gene relacionado à EAG (ERG, Kv11) e EAG-símile (ELK, Kv12), e são codificadas pela família de genes KCNH. A conformação tridimensional do canal EAG1 (WHICHER e MACKINNON, 2016) e do ERG1 (WANG e MACKINNON, 2017) foram publicadas recentemente. Estas caracterizações mostraram novas percepções sobre os seus diferentes domínios estruturais e evidenciaram diferenças funcionais em relação à família dos canais *Shaker*-símile (Kv1.x a Kv4.x) (BAUER e SCHWARZ, 2018).

Assim como todos os canais para potássio dependentes de voltagem, os canais EAG são compostos por quatro subunidades, com seis segmentos transmembrana cada (S1-S6), que formam o domínio sensível à voltagem (VSD, *voltage sensor domain*), nos segmentos S1 a S4, e o domínio do poro, que compreende os domínios S5 e S6. Quando comparados aos canais *Shaker*-símile, os canais da família EAG exibem algumas diferenças em suas características. O seu filtro de seletividade apresenta uma sequência própria desta família (TVGFNG), ao invés da sequência clássica de Kvs (TVGYGD). Entretanto, esta diferença aparenta não ter influência nas dimensões do filtro de seletividade e, portanto, não altera a seletividade destes canais ao potássio (WANG e MACKINNON, 2017).

Nos canais do tipo *Shaker*, a ligação dos domínios S4-S5 é uma longa hélice composta por 15 resíduos. Acredita-se que esta hélice funcione como uma espécie de alavanca, transferindo os movimentos do domínio sensível à voltagem para o portão de ativação do canal. Esta estrutura está localizada no domínio do poro das subunidades vizinhas, característica denominada “*domain swapped*” (LONG et al., 2005). Por outro lado, os canais da família EAG não apresentam o motivo PRO-x-PRO no segmento S6 e a ligação dos domínios S4-S5 é um pequeno *loop* não helicoidal, constituído por cinco resíduos que, por conta do seu tamanho reduzido, não são do tipo “*domain swapped*” (LORINCZI et al., 2015).

Recentemente foi relatado que algumas SVSPs, particularmente a collineina-1, são capazes de inibir o canal para potássio hEAG1. Estudos de mutação sítio-dirigida foram conduzidos e mostraram que a inibição deste canal iônico é independente da sua atividade enzimática. Através de estudos de modelagem e *docking* molecular, sugeriu-se que a collineina-1 ancora-se no hEAG1, de modo reversível, através de diversas interações com diferentes resíduos de aminoácidos do canal. No total, 20 resíduos da collineina-1 fazem ligações de hidrogênio com 23 resíduos de diferentes subunidades do canal, além de 17 interações

hidrofóbicas, (Fig. 11), revelando uma forte interface de interação entre as estruturas. Esta interação é evidenciada pelos baixos valores de IC_{50} apresentados pela collineina-1 nativa ($4,2 \pm 0,5 \mu M$), recombinante ($2,5 \pm 0,3 \mu M$) e mutante ($4,3 \pm 0,8 \mu M$) (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2020).

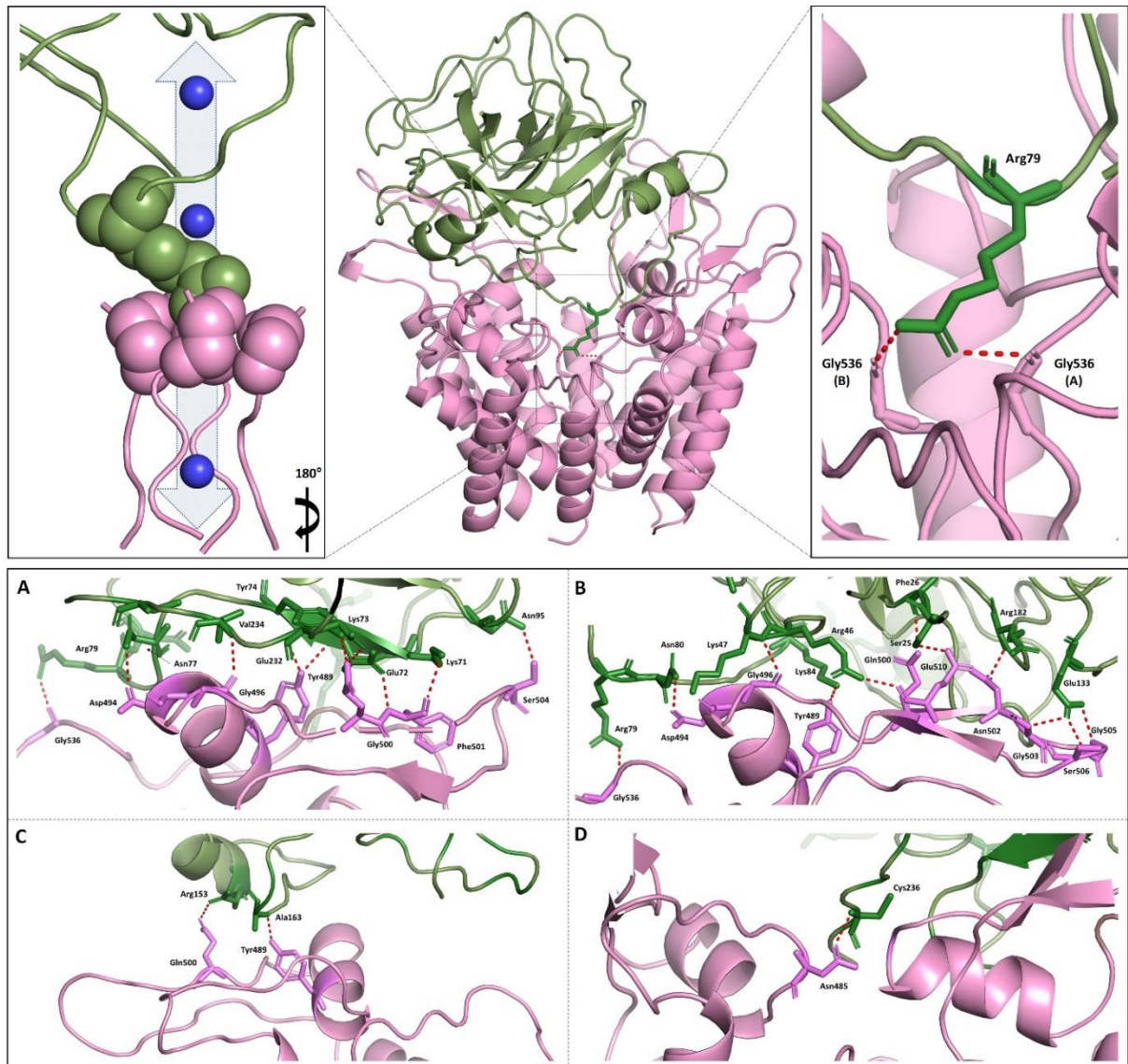


Figura 11. Docking molecular entre a collineina-1 e o canal iônico hEAG1. Visualização lateral das estruturas, validada por ensaios de dinâmica molecular. O painel ampliado à esquerda mostra o bloqueio do poro condutor de íons do canal pelo resíduo R79 da collineina-1, enquanto o da direita destaca as ligações de hidrogênio entre o resíduo R79 da collineina-1 e os resíduos de Glicina 536 das subunidades 'A' e 'B' do canal iônico. Os painéis de (A) a (D) enfatizam as interfaces de interação entre a collineina-1 e as diferentes subunidades do hEAG1. Imagem elaborada pelo autor.

O *docking* molecular proposto revelou um farmacóforo que compreende um resíduo de arginina (R79) na estrutura da collineína-1, cuja cadeia lateral faz ligações de hidrogênio com os resíduos de glicina (G536) de duas subunidades do canal iônico. O resíduo R79 projeta-se do loop 99 da collineína-1, que circunda a entrada do sítio ativo da enzima. Através desta interação, há uma obstrução do poro do hEAG1, impedindo a passagem de íons (Fig. 12). O modelo proposto de bloqueio do poro do canal corrobora os dados eletrofisiológicos obtidos, os quais mostraram que não há um desvio significativo da curva de ativação dependente de voltagem do canal.

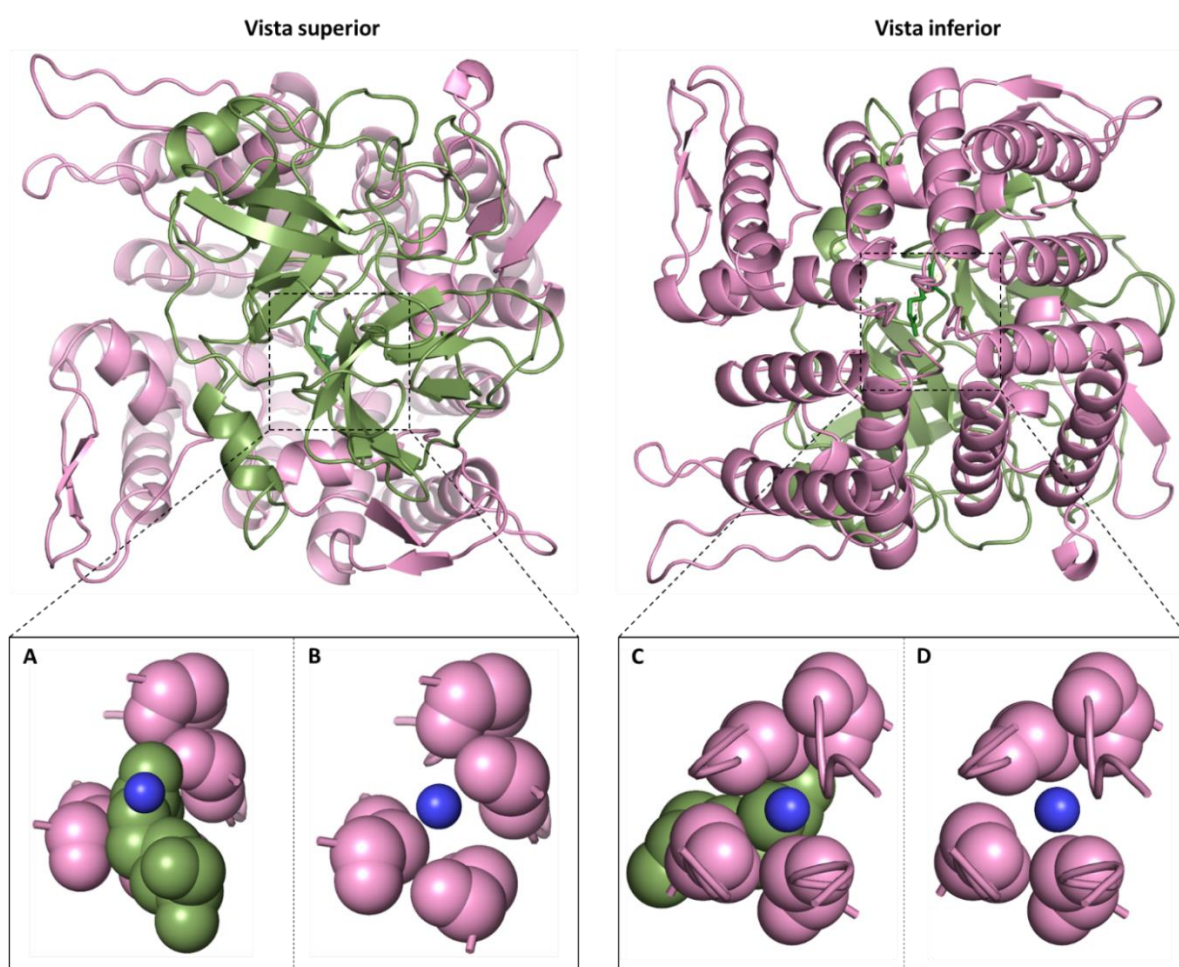


Figura 12. Vista superior e inferior do *docking* molecular proposto entre a collineína-1 e o hEAG1. Os painéis ampliados de cada estrutura mostram o bloqueio do filtro de seletividade do hEAG1 pelo resíduo R79 da collineína-1. Os painéis A e B representam, em uma vista superior, o filtro de seletividade na presença e na ausência de collineína-1, respectivamente. Os painéis C e D representam, em uma vista inferior, o filtro de seletividade na presença e na ausência de collineína-1, respectivamente. A colineína-1 é representada pela estrutura em verde e o canal hEAG1 é representado pela estrutura em rosa. O íon de potássio é representado como uma esfera azul. Imagem elaborada pelo autor.

No contexto do potencial antitumoral da collineína-1, foi avaliada a dose-resposta de citotoxicidade em duas linhagens celulares cancerígenas (hepatocarcinoma celular, HepG2, e adenocarcinoma mamário, MCF7) e uma linhagem não tumoral (célula epitelial mamária, MCF10A) (Fig. 13). A collineína-1 não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas para as linhagens celulares HepG2 e MCF10A. Por outro lado, na linhagem tumoral MCF7, as concentrações de 2 a 8 μM reduziram, de modo significativo, a viabilidade celular, embora não tenha sido observado um padrão de dose-resposta nesta atividade.

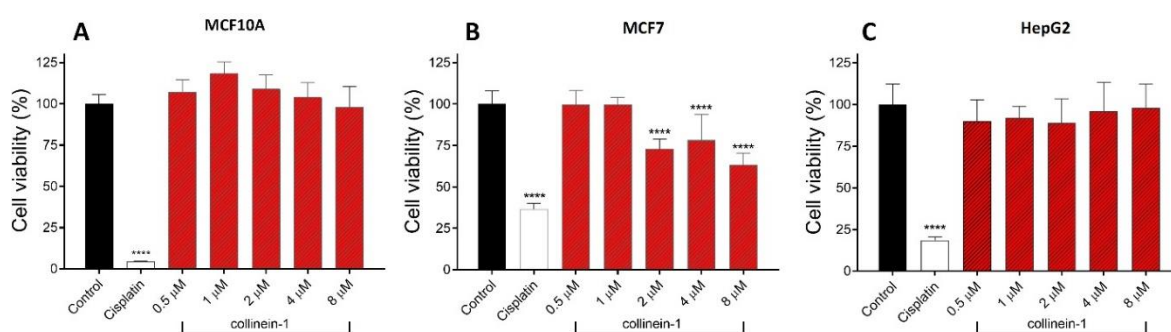


Fig. 13. Viabilidade celular das linhagens celulares MCF10A (A), MCF7 (B) e HepG2 (C), avaliada por MTT após o tratamento com diferentes concentrações de collineína-1. Resultados expressos pela média \pm DP para três experimentos independentes ($n = 3$). Controle negativo: PBS; controle positivo: cisplatina. (****) $p < 0,0001$, em relação ao controle negativo (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey). Imagem elaborada pelo autor.

A superexpressão de canais pertencentes à superfamília EAG foi demonstrada em cerca de 80% dos cânceres de mama (WALLACE et al., 2011). Na linha celular tumoral MCF7, os canais hEAG1 estão envolvidos no aumento da proliferação e na progressão do ciclo celular (ROY et al., 2008). Por outro lado, a expressão de hEAG1 em células de carcinoma hepatocelular (HepG2) parece estar limitada aos estágios iniciais do desenvolvimento neoplásico, embora o papel preciso dos canais de hEAG1 nessa linha de tumor não foi completamente elucidado (CHAVEZ-LOPEZ et al., 2015). Uma vez que a collineína-1 foi capaz de reduzir a viabilidade das células tumorais MCF7, é possível sugerir que o efeito antitumoral da toxina possa estar relacionado à inibição dos canais hEAG1 nessa linha tumoral. No entanto, os mecanismos antitumorais da collineína-1, bem como seus efeitos na proliferação, apoptose e ciclo celular, ainda precisam ser investigados de forma mais abrangente.

Diversos estudos na literatura relataram a expressão exacerbada de canais iônicos pertencentes à família EAG, particularmente hEAG1 e hERG1, em diferentes células neoplásicas. Estes canais desempenham papéis fundamentais na progressão tumoral, envolvidos em mecanismos de controle de volume celular, proliferação, migração e apoptose (CAZARES-ORDONEZ e PARDO, 2017; HE et al., 2020). A superexpressão de hEAG1 e hERG1 em células cancerígenas tem aumentado o interesse da comunidade científica na possível aplicação destas estruturas como marcadores tumorais, fatores de prognóstico e/ou alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer.

1.4. Expressão de toxinas animais em sistema heterólogo

Os primeiros tratamentos biofarmacêuticos foram desenvolvidos no final do século 19, com a criação das primeiras vacinas e a proliferação de transfusões de sangue seguras e repetíveis. O início do século 20 foi marcado pela descoberta e aplicação de produtos como insulina, derivada de fontes animais; e penicilina, cuja produção em escala industrial foi desenvolvida durante a Segunda Guerra Mundial. A revolução biotecnológica redesenhou a pesquisa, desenvolvimento, produção e até mesmo o processo de marketing dos medicamentos. Novos e poderosos instrumentos científicos e tecnológicos relacionados à biotecnologia, genômica e proteômica, por exemplo, possibilitaram a descoberta e o estudo de proteínas e outras macromoléculas que anteriormente não era possível (STRYJEWSKA et al., 2013; LALOR et al., 2019; ZHANG et al., 2020).

A tecnologia de DNA recombinante (rDNA) reportada por Cohen e Boyer (COHEN et al., 1973; MORROW et al., 1974) permitiu a produção de uma variedade de peptídeos, proteínas e outras biomoléculas por células que, naturalmente, não sintetizariam tais compostos. Esta tecnologia, com aproximadamente 45 anos de idade, está se tornando uma das mais importantes ferramentas desenvolvidas no século 20 (STRYJEWSKA et al., 2013). Recentemente, o número de proteínas recombinantes utilizadas em aplicações terapêuticas aumentou consideravelmente. Muitas destas macromoléculas são complexas glicoproteínas e anticorpos, com elevada necessidade de produção. Esta demanda direcionou o aperfeiçoamento dos métodos de produção heteróloga de proteínas, particularmente envolvendo células de mamíferos e culturas de microrganismos (ANDERSEN e KRUMMEN, 2002).

O termo “biofármaco” compreende as proteínas recombinantes utilizadas em âmbito clínico, incluindo enzimas, anticorpos e produtos baseados em ácidos nucleicos. Atualmente, proteínas e peptídeos são as classes predominantes de moléculas sob investigação ou em uso.

Entretanto, este cenário tende a se modificar nos próximos anos, com as outras classes de moléculas ganhando similar importância (WALSH, 2010b).

Produtos farmacêuticos e enzimas industriais foram os primeiros produtos biotecnológicos a serem produzidos através do uso do DNA recombinante. Dentro deste contexto, a insulina recombinante foi o primeiro biofármaco aprovado para uso em humanos, produzida em *Escherichia coli*. Desde então, o mercado de proteínas e peptídeos recombinantes utilizados na terapêutica tem crescido rapidamente. Entre 8 a 12 medicamentos são aprovados, a cada ano, representando em torno de 25% de novas moléculas que entram no mercado (WALSH, 2014).

Diversos sistemas envolvendo células procarióticas e eucarióticas foram desenvolvidos, a fim de facilitar a produção de proteínas recombinantes. Por diferentes razões, econômicas, práticas e regulatórias, apenas alguns sistemas são empregados para a produção de biofármacos. Estes sistemas geralmente envolvem o uso da bactéria *E. coli*, diferentes espécies de fungos (*Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae*) e algumas linhagens celulares de mamíferos (BERLEC e STRUKELJ, 2013; BANDARANAYAKE e ALMO, 2014). A figura 14 ilustra os principais tipos de células utilizadas para a produção de proteínas recombinantes, com vantagens e desvantagens referentes a cada classe.

Apesar dos recentes avanços empregando rDNA em células de mamíferos, as leveduras permanecem como opções interessantes para a produção heteróloga de proteínas (WALSH, 2014; LOVE et al., 2018). Estes organismos são hospedeiros alternativos promissores para a fabricação de proteínas recombinantes, uma vez que atendem de forma simples e eficiente as necessidades tanto de medicamentos de larga escala de produção quanto aqueles de pequeno mercado. O rápido acúmulo de biomassa, aliado ao baixo custo de manutenção, reduz o valor dos medicamentos produzidos em leveduras, que por sua vez pode permitir processos de fabricação mais eficientes.



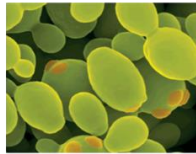
Bactérias

Principais vantagens:

- Meio rápido de expressão
- Método barato
- Fácil *scale-up* de produção

Principais desvantagens:

- Ausência de modificações pós-traducionais;
- Dificuldade de produção de proteínas em conformação funcional.



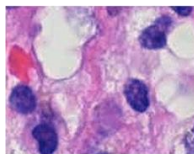
Leveduras

Principais vantagens:

- Meio rápido de expressão
- Realiza modificações pós-traducionais

Principais desvantagens:

- Padrões de glicosilação diferentes daqueles encontrados em humanos



Células de mamíferos

Principais vantagens:

- Realiza modificações pós-traducionais semelhante aos humanos

Principais desvantagens:

- Expansão celular lenta
- Método oneroso de produção
- Dificuldade de *scale up* na produção

Figura 14. Principais meios de produção de proteínas recombinantes utilizadas atualmente. Cada classe é representada com as suas principais vantagens e desvantagens para a produção de biofármacos. Imagem elaborada pelo autor.

A levedura metilotrófica *P. pastoris* tem sido utilizada há décadas como fábrica biológica de proteínas recombinantes (JUTURU e WU, 2018; KARBALAEI et al., 2020). Suas principais vantagens estão associadas à fácil manipulação genética, gerando linhagens celulares estáveis, e alto crescimento em meios de cultura, quando comparadas àquelas apresentadas por células de mamíferos, por exemplo (LOVE et al., 2018).

Além disso, os vetores de expressão são facilmente preparados e podem favorecer a incorporação de múltiplas cópias da proteína de interesse, além de permitir a produção de proteínas multiméricas com diferentes subunidades. Outra vantagem está relacionada ao uso de promotores específicos que direcionam a maquinaria celular para a produção da proteína recombinante (GASSER e MATTANOVICH, 2018). Assim, há um favorecimento da produção de grandes quantidades do produto, além de ser uma técnica relativamente simples e barata, quando comparada a outros tipos de sistemas de expressão heteróloga em células eucarióticas (AMORIM et al., 2018). Por fim, estes organismos combinam as vantagens de organismos unicelulares, como a facilidade da manipulação genética e rápido crescimento, com a habilidade de executar modificações pós-traducionais, mecanismo existente somente em organismos eucariotos (CELIK e CALIK, 2012).

A escolha do sistema de expressão heteróloga adequado é uma das partes fundamentais durante o processo de desenvolvimento de um novo biofármaco. Embora detalhes envolvendo

processos patentários e aspectos econômicos sejam importantes nesta tomada de decisão, é fundamental considerar, nesta escolha, o sistema mais adequado e eficiente para a produção da molécula recombinante (WALSH, 2010b).

Apesar de as toxinas encontradas nas peçonhas de serpentes apresentarem um grande potencial de aplicabilidade biotecnológica e terapêutica (MUNAWAR et al., 2018; PEIGNEUR e TYTGAT, 2018; BORDON et al., 2020), a pequena quantidade obtida destas proteínas, por meio da extração da peçonha, muitas vezes impossibilita sua aplicação terapêutica ou biotecnológica (BOLDRINI-FRANCA et al., 2017). Deste modo, a expressão heteróloga de toxinas tem se mostrado um método efetivo na obtenção destas macromoléculas, possibilitando, assim, sua caracterização funcional e estrutural, passo fundamental para a sua aplicação em diversas áreas (AMORIM et al., 2018).

SVSPs de diferentes serpentes já foram expressas em sistemas heterólogos, utilizando leveduras: *Trimeresurus albolabris* (PRADNIWAT e ROJNUCKARIN, 2015), *Bothrops atrox* (LI et al., 2007), *Gloydius shedaoensis* (YANG et al., 2009), *Agkistrodon caliginosus* (YUAN et al., 2009), *Agkistrodon rhodostoma* (ZHANG et al., 2011), *Crotalus durissus collilineatus* (BOLDRINI-FRANCA et al., 2015), e *Bothrops pauloensis* (ISABEL et al., 2016). Ademais, já foi relatada a expressão de uma SVSP da serpente *C. d. terrificus* em células de mamíferos (YONAMINE et al., 2009), e também de duas SVSPs, de *Cerastes cerastes* (DEKHIL et al., 2003) e *Deinagkistrodon Acutus* (LI et al., 2018), em *E. coli*. Entretanto, não há relatos da PEGlação de SVSPs recombinantes, buscando sua aplicação biotecnológica ou terapêutica.

1.5. Produção, PEGlação e o mercado farmacêutico de proteínas recombinantes

Biofármacos são medicamentos derivados de proteínas e peptídeos obtidos, na maioria das vezes, em organismos geneticamente modificados, como bactérias, leveduras e células animais e vegetais (WOHLRAB, 2019). Estes medicamentos aumentaram a eficácia do tratamento de inúmeras patologias que trazem risco à vida ou que são de grau crônico em humanos, relacionados à hemostasia, tumores, doenças mediadas pelo sistema imune, como artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, lúpus eritematoso sistêmico e psoríase (WALSH, 2010a). Estas moléculas pertencem a várias classes de compostos, como hormônios, fatores de crescimento, anticorpos, enzimas, inibidores e vacinas (RYU et al., 2012).

Em 2020, 13 novos biofármacos foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration* – EUA) para uso humano (Fig. 15). Além destes, outros quatro biofármacos

foram aprovados pelo “*Center for Biologics Evaluation and Research*”, uma divisão do FDA responsável especialmente pelo licenciamento de novos biofármacos naquele país (MULLARD, 2021). Entre os recentes medicamentos aprovados, encontra-se o “Esperoct” (Novo Nordisk®, Dinamarca), composto pelo Fator VIII recombinante PEGlado, indicado no tratamento da hemofilia A (EZBAN et al., 2020).

Além dos biofármacos comercialmente disponíveis, muitos estão em períodos de testes clínicos ou pré-clínicos. Em 2015, cinco dos 15 medicamentos mais vendidos mundialmente eram derivados de proteínas ou peptídeos, e correspondiam por cerca de 25% do total de vendas. Os biofármacos alcançaram um valor de venda global de 174,7 bilhões de dólares naquele ano, com uma avaliação anual de crescimento de 7,3%, além estimativas de alcançarem 248,7 bilhões de dólares em 2020 (AGYEI et al., 2017).

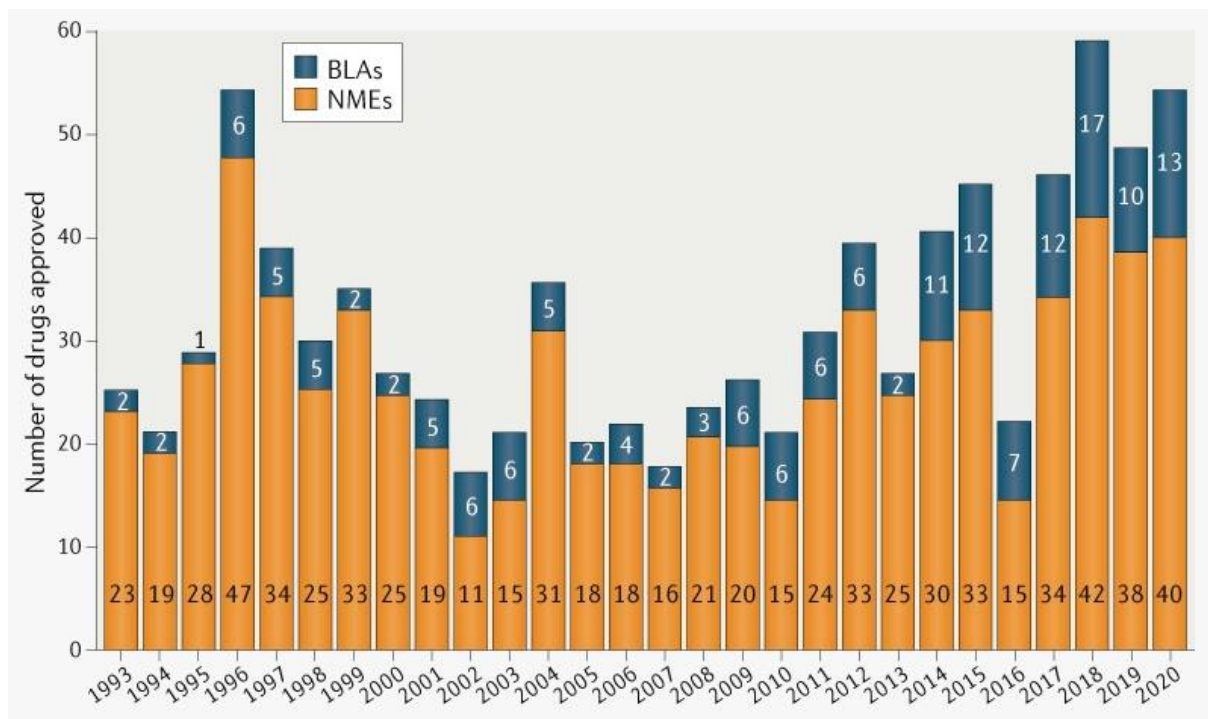


Figura 15. Total de novos medicamentos aprovados para uso humano, entre 1993 e 2020 pelo FDA. Colunas em laranja: medicamento cujo princípio ativo são pequenas moléculas orgânicas ou inorgânicas; colunas em azul escuro: biofármacos. Fonte: MULLARD, 2021.

Atualmente, 20% do mercado farmacêutico é composto por biofármacos. Este mercado cresce duas vezes mais, a cada ano, quando comparado aos outros tipos de medicamentos (SAUNA et al., 2018). O uso de proteínas e peptídeos na terapêutica tem expandido nos últimos anos devido à: (1) descoberta de novas biomoléculas; (2) melhor entendimento de seus mecanismos de ação *in vivo*; (3) avanços na expressão heteróloga ou síntese de proteínas e

peptídeos com ação terapêutica e (4) aperfeiçoamentos nas formulações ou tecnologias de alterações moleculares que possuem a capacidade de distribuir polipeptídeos *in vivo* com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas melhoradas (ROBERTS et al., 2002). Em 2019, quatro em cada 10 medicamentos em desenvolvimento eram derivados de biotecnologia. A crescente demanda por medicamentos personalizados e medicamentos órfãos (*orphan drugs*) está impulsionando os investimentos em P&D em biofármacos.

Por outro lado, grande parte das proteínas de uso terapêutico apresenta algum grau de resposta humoral, devido à imunogenicidade intrínseca destas moléculas exógenas. A imunogenicidade é caracterizada pela presença de anticorpos contra determinado (bio)fármaco (ADAs – *Anti-drug antibodies*), detectados na circulação sanguínea após a administração do medicamento (GARCES e DEMENGEOT, 2018).

Os ADAs que se ligam ao sítio ativo da molécula e inibem a sua atividade são denominados de anticorpos neutralizantes. Os anticorpos não-neutralizantes são aqueles que não se ligam no sítio ativo, porém ainda podem produzir efeitos clínicos importantes, como redução da eficácia terapêutica, através do comprometimento da biodisponibilidade, por exemplo (BENDTZEN, 2012). A geração de ADAs, sendo eles neutralizantes ou não, cada vez mais é reconhecida como um mecanismo para explicar a redução ou ausência da eficácia de determinados medicamentos (PINEDA et al., 2016).

Esta resposta do sistema imunológico pode levar à perda da eficácia terapêutica, sua neutralização, ou ainda a efeitos adversos, como complicações semelhantes às aquelas apresentadas pela doença do soro, reações à perfusão e anafilaxia (SCHELLEKENS, 2002; 2005; WOLBINK et al., 2009). Desta maneira, um dos desafios da medicina moderna é o desenvolvimento de metodologias que reduzam a imunogenicidade dos biofármacos, de modo a aumentar sua eficácia terapêutica (BENDER et al., 2007; LALOR et al., 2019; VANDERLAAN et al., 2020).

A avaliação da imunogenicidade é uma das etapas principais no desenvolvimento de qualquer biofármaco, incluindo aqueles denominados biossimilares (GARCES e DEMENGEOT, 2018). Neste contexto, diversos fatores podem influenciar esta característica, os quais podem ser categorizados em três itens distintos. O primeiro deles, associado ao tratamento, envolve o mecanismo de ação do medicamento, via e frequência de administração e duração da terapia. Em segundo lugar, temos os fatores associados ao paciente, que compreendem o tipo de patologia por ele apresentado, a evolução da doença, a condição do sistema imune, fatores genéticos, presença de patologias secundárias, medicamentos

complementares em uso durante a terapia e exposição e/ou sensibilização prévia ao medicamento em uso. Por fim, os fatores associados ao medicamento incluem o sistema de expressão heteróloga utilizado para a produção do medicamento, modificações pós-traducionais presentes na proteína e a presença de impurezas, contaminantes e agregados na formulação (PINEDA et al., 2016).

No contexto da modificação de produtos farmacêuticos, o termo PEGlação descreve a modificação de biomoléculas pela conjugação covalente com polietilenoglicol (PEG), um polímero não tóxico e não imunogênico, usado como estratégia para superar as desvantagens associadas aos biofármacos, apresentadas anteriormente (VERONESE e MERO, 2008; WAN et al., 2017). A ligação covalente de PEG às proteínas é uma tecnologia bem estabelecida e largamente utilizada, cumprindo vários requisitos que visam a segurança e eficácia de medicamentos (FREITAS DDA e ABRAHAO-NETO, 2010; JEVSEVAR et al., 2010; HOANG THI et al., 2020; THAKOR et al., 2020).

A PEGlação pode modificar as propriedades físicas e químicas da biomolécula, como sua conformação, interações eletrostáticas e hidrofobicidade, resultando na melhora do comportamento farmacocinético do medicamento, além de outros benefícios (Fig. 16) (MAIER et al., 2019). Na sua forma mais comum, o polietilenoglicol é uma cadeia linear ou ramificada, terminada com grupos hidroxílicos, apresentando a estrutura geral $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ (ROBERTS et al., 2002). Este processo pode ocorrer em diferentes locais da proteína (SANTOS et al., 2018), dependendo do tipo de PEG utilizado e da aplicação desejada (Fig. 17).



Figura 16. Benefícios da PEGlação de proteínas e peptídeos na aplicação destas moléculas na área terapêutica. Imagem elaborada pelo autor.

De maneira geral, a PEGlação beneficia a solubilização destas moléculas, além de reduzir sua imunogenicidade. Adicionalmente, há também uma melhora na estabilidade da estrutura, bem como a redução do *clearance* total do biofármaco, diminuindo, desta forma, a frequência de administração do medicamento (GEFEN et al., 2013; FEREBEE et al., 2016; OZTURK-ATAR et al., 2018). A frequência de administração de medicamentos é uma das maiores limitações para a aplicação terapêutica de alguns fármacos, uma vez que pacientes tendem a apresentar baixa aderência ao tratamento com fármacos que requerem múltiplas administrações diárias (TAVARES et al., 2016).



Figura 17. Possíveis sítios de PEGlação de proteínas e peptídeos. A PEGlação destes compostos pode ocorrer em diferentes sítios, de acordo com o derivado de polietilenoglicol utilizado, efeito estérico e disposição dos grupos disponíveis para PEGlação na proteína de interesse. Imagem elaborada pelo autor.

Embora essa ferramenta de modificação molecular tenha sido largamente empregada na produção de biofármacos (Tab. 1), seu uso em toxinas permanece restrito, ainda que seja uma estratégia promissora para aumentar o uso terapêutico destas moléculas. Em relação às SVSPs, apenas uma toxina, em sua forma nativa, foi PEGlada com sucesso até o momento (DA-SILVA-FREITAS et al., 2015). A modificação desta SVSP pela conjugação ao PEG trouxe melhoras significativas, como o aumento da sua eficiência catalítica, bem como a diminuição do valor de K_m calculado.

Tabela 1. Medicamentos PEGlados aprovados pelo FDA para uso em humanos

Nome comercial	Companhia farmacêutica	Sítio de PEGlação	Tamanho do PEG (kDa)	Indicação terapêutica	Ano de aprovação
Adagen	Enzon	Lisina	5	Imunodeficiência combinada severa	1990
Oncaspar	Enzon	Lisina	5	Leucemia linfoblástica aguda	1994
PEG-INTRON	Schering-Plough	Histina, cisteína, lisina, serina e tirosina	12	Hepatite C	2000
PEGASYS	Hoffman-La Roche	Lisina	40	Hepatite C	2001
Neulasta	Amgen	N-terminal	20	Neutropenia	2002
Somavert	Pfizer	Lisinas, N-terminal	5	Acromegalia	2003
Macugen	Pfizer	Lisina	40	Degeneração macular ligada à idade	2004
Mircera	Hoffman-La Roche	Lisina	30	Anemia associada à falência renal crônica	2007
Cimzia	UCB	C-terminal	40	Doença de Crohn	2008
Krystexxa	Savient	Lisina	10	Gota crônica	2010
Sylatron	Merck	Histidina, cisteína, lisina, serina, tirosina	12	Melanoma	2011
Omontys	Affymax/Takeda	Lisina	40	Anemia associada com doença renal crônica	2012
Plegridy	Biogen	N-terminal	20	Esclerose múltipla	2014
Adynovate	Baxalta	Lisina	20	Hemofilia A	2015
Esperoct	Novo Nordisk	Glicosilação	40	Hemofilia A	2019

Deste modo, é notável o potencial que esta técnica de modificação molecular, aliada às atividades específicas das SVSPs, pode trazer para a aplicação terapêutica e biotecnológica destas toxinas. Sendo assim, nesta tese é descrita a PEGlação de uma serinoprotease da peçonha de *C. d. collilineatus*, produzida de maneira recombinante em sistema de expressão *Pichia pastoris*, visando sua futura aplicação terapêutica e/ou biotecnológica.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGYEI, D. et al. Protein and Peptide Biopharmaceuticals: An Overview. **Protein and Peptide Letters**, v. 24, n. 2, p. 94-101, 2017.

AMICONI, G. et al. A novel venombin B from *Agkistrodon contortrix contortrix*: evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from thrombin. **Biochemistry**, v. 39, n. 33, p. 10294-308, 2000.

AMORIM, F. G. et al. Microbial production of toxins from the scorpion venom: properties and applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 102, n. 15, p. 6319-6331, 2018.

ANDERSEN, D. C.; KRUMMEN, L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. **Curr Opin Biotechnol**, v. 13, n. 2, p. 117-23, 2002.

BANDARANAYAKE, A. D.; ALMO, S. C. Recent advances in mammalian protein production. **FEBS Lett**, v. 588, n. 2, p. 253-60, 2014.

BAUER, C. K.; SCHWARZ, J. R. Ether-a-go-go K(+) channels: effective modulators of neuronal excitability. **J Physiol**, v. 596, n. 5, p. 769-783, 2018.

BENDER, N. K. et al. Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. **Rheumatol Int**, v. 27, n. 3, p. 269-74, 2007.

BENDTZEN, K. Anti-TNF-alpha biotherapies: perspectives for evidence-based personalized medicine. **Immunotherapy**, v. 4, n. 11, p. 1167-79, 2012.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Biochemistry. 5th. **New York: WH Freeman**, v. 38, n. 894, p. 76, 2002.

BERLEC, A.; STRUKELJ, B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 40, n. 3-4, p. 257-74, 2013.

BERNECHE, S.; ROUX, B. A gate in the selectivity filter of potassium channels. **Structure**, v. 13, n. 4, p. 591-600, 2005.

BOLDRINI-FRANCA, J. et al. Minor snake venom proteins: Structure, function and potential applications. **Biochim Biophys Acta**, v. 1861, n. 4, p. 824-838, 2017.

BOLDRINI-FRANCA, J. et al. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **J Proteomics**, v. 73, n. 9, p. 1758-76, 2010.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Beyond hemostasis: a snake venom serine protease with potassium channel blocking and potential antitumor activities. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 4476, 2020.

BOLDRINI-FRANCA, J. et al. *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: analysis of gene expression profile. **Biochimie**, v. 91, n. 5, p. 586-95, 2009.

BOLDRINI-FRANCA, J. et al. Expression of a new serine protease from *Crotalus durissus collilineatus* venom in *Pichia pastoris* and functional comparison with the native enzyme. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2015.

BON, C. et al. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta Physiol Pharmacol Latinoam**, v. 39, n. 4, p. 439-48, 1989.

BORDON, K. C. F. et al. From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. **Front Pharmacol**, v. 11, p. 1132, 2020.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 851-9, 2000.

CARBONE, E.; MORI, Y. Ion channelopathies to bridge molecular lesions, channel function, and clinical therapies. **Pflugers Arch**, v. 472, n. 7, p. 733-738, 2020.

CARDOSO, J. O. L. C. **Animais peçonhentos no Brasil : biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1a. São Paulo, Brasil: Sarvier : FAPESP, 2003. 468 p. ISBN 8573781335.

CARNEVALE, V.; KLEIN, M. L. Small molecule modulation of voltage gated sodium channels. **Curr Opin Struct Biol**, v. 43, p. 156-162, 2017.

CATTERALL, W. A. The molecular basis of neuronal excitability. **Science**, v. 223, n. 4637, p. 653-61, 1984.

_____. Structure and function of voltage-gated ion channels. **Annu Rev Biochem**, v. 64, p. 493-531, 1995.

_____. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, v. 26, n. 1, p. 13-25, 2000.

CATTERALL, W. A. et al. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. **Toxicon**, v. 49, n. 2, p. 124-41, 2007.

CATTERALL, W. A.; LENAEUS, M. J.; GAMAL EL-DIN, T. M. Structure and Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 60, p. 133-154, 2020.

- CAZARES-ORDONEZ, V.; PARDO, L. A. Kv10.1 potassium channel: from the brain to the tumors. **Biochem Cell Biol**, v. 95, n. 5, p. 531-536, 2017.
- CELIK, E.; CALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnol Adv**, v. 30, n. 5, p. 1108-18, 2012.
- CESTELE, S.; CATTERALL, W. A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 883-92, 2000.
- CHANG, C. C.; TSENG, K. H. Effect of crostamine, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. **Br J Pharmacol**, v. 63, n. 3, p. 551-9, 1978.
- CHAVEZ-LOPEZ, M. D. et al. Astemizole-based anticancer therapy for hepatocellular carcinoma (HCC), and Eag1 channels as potential early-stage markers of HCC. **Tumor Biology**, v. 36, n. 8, p. 6149-6158, 2015.
- CHOE, S. Potassium channel structures. **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 2, p. 115-21, 2002.
- CLAIRFEUILLE, T. et al. Voltage-gated sodium channels viewed through a structural biology lens. **Curr Opin Struct Biol**, v. 45, p. 74-84, 2016.
- COHEN, S. N. et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 70, n. 11, p. 3240-4, 1973.
- COLE, K. S. Dynamic Electrical Characteristics of the Squid Axon Membrane. **Archives Des Sciences Physiologiques**, v. 3, n. 2, p. 253-258, 1949.
- COLOGNA, C. T. et al. Investigation of the relationship between the structure and function of Ts2, a neurotoxin from Tityus serrulatus venom. **FEBS J**, v. 279, n. 8, p. 1495-504, 2012.
- DA-SILVA-FREITAS, D.; BOLDRINI-FRANCA, J.; ARANTES, E. C. PEGylation: a successful approach to improve the biopharmaceutical potential of snake venom thrombin-like serine protease. **Protein Pept Lett**, v. 22, n. 12, p. 1133-9, 2015.
- DE LERA RUIZ, M.; KRAUS, R. L. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. **J Med Chem**, v. 58, n. 18, p. 7093-118, 2015.
- DEKHIL, H. et al. Molecular cloning and expression of a functional snake venom serine proteinase, with platelet aggregating activity, from the Cerastes cerastes viper. **Biochemistry**, v. 42, n. 36, p. 10609-18, 2003.
- DEUIS, J. R. et al. The pharmacology of voltage-gated sodium channel activators. **Neuropharmacology**, 2017.
- DOYLE, D. A. et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. **Science**, v. 280, n. 5360, p. 69-77, 1998.

EZBAN, M.; HANSEN, M.; KJALKE, M. An overview of turoctocog alfa pegol (N8-GP; ESPEROCT((R))) assay performance: Implications for postadministration monitoring. **Haemophilia**, v. 26, n. 1, p. 156-163, 2020.

FEREBEE, R. et al. Light Scattering Analysis of Mono- and Multi-PEGylated Bovine Serum Albumin in Solution: Role of Composition on Structure and Interactions. **J Phys Chem B**, v. 120, n. 20, p. 4591-9, 2016.

FRANCISCHETTI, I. M. et al. Convulxin, a potent platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom, specifically binds to platelets. **Toxicon**, v. 35, n. 8, p. 1217-28, 1997.

FREITAS DDA, S.; ABRAHAO-NETO, J. Biochemical and biophysical characterization of lysozyme modified by PEGylation. **Int J Pharm**, v. 392, n. 1-2, p. 111-7, 2010.

FUX, J. E. et al. Eukaryotic Voltage-Gated Sodium Channels: On Their Origins, Asymmetries, Losses, Diversification and Adaptations. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 2018.

GARCES, S.; DEMENGEOT, J. The Immunogenicity of Biologic Therapies. **Curr Probl Dermatol**, v. 53, p. 37-48, 2018.

GASKIN, D. J.; RICHARD, P. The economic costs of pain in the United States. **J Pain**, v. 13, n. 8, p. 715-24, 2012.

GASSER, B.; MATTANOVICH, D. A yeast for all seasons—Is *Pichia pastoris* a suitable chassis organism for future bioproduction? **FEMS microbiology letters**, v. 365, n. 17, p. fny181, 2018.

GEFEN, T. et al. The impact of PEGylation on protein immunogenicity. **Int Immunopharmacol**, v. 15, n. 2, p. 254-9, 2013.

GOLDIN, A. L. Resurgence of sodium channel research. **Annu Rev Physiol**, v. 63, p. 871-94, 2001.

GUTMAN, G. A. et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 4, p. 473-508, 2005.

HABERMANN, E.; BREITHAUPT, H. Mini-review. The crotoxin complex--an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**, v. 16, n. 1, p. 19-30, 1978.

HALFON, S.; CRAIK, C. S. Introduction: serine peptidases and their clans: Handbook of proteolytic enzymes. In: (Ed.). **Handbook of proteolytic enzymes**: Academic Press, London, 1998, v.3-4, 1998.

HALL, C. E.; SLAYTER, H. S. The fibrinogen molecule: its size, shape, and mode of polymerization. **J Biophys Biochem Cytol**, v. 5, n. 1, p. 11-6, 1959.

HE, S. et al. HERG channel and cancer: A mechanistic review of carcinogenic processes and therapeutic potential. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer**, p. 188355, 2020.

HOANG THI, T. T. et al. The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation. **Polymers (Basel)**, v. 12, n. 2, 2020.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. **J Physiol**, v. 117, n. 4, p. 500-44, 1952.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F.; KATZ, B. Measurement of Current-Voltage Relations in the Membrane of the Giant Axon of Loligo. **Journal of Physiology-London**, v. 116, n. 4, p. 424-448, 1952.

HUMPHRIES, E. S. A.; DART, C. Neuronal and Cardiovascular Potassium Channels as Therapeutic Drug Targets: Promise and Pitfalls. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 9, p. 1055-1073, 2015.

IMBRICI, P. et al. Therapeutic Approaches to Genetic Ion Channelopathies and Perspectives in Drug Discovery. **Front Pharmacol**, v. 7, p. 121, 2016.

ISABEL, T. F. et al. Expression and partial biochemical characterization of a recombinant serine protease from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 115, p. 49-54, 2016.

JENTSCH, T. J.; HUBNER, C. A.; FUHRMANN, J. C. Ion channels: function unravelled by dysfunction. **Nat Cell Biol**, v. 6, n. 11, p. 1039-47, 2004.

JEVSEVAR, S.; KUNSTELJ, M.; POREKAR, V. G. PEGylation of therapeutic proteins. **Biotechnol J**, v. 5, n. 1, p. 113-28, 2010.

JUNG, S. Y. et al. The Vroman effect: A molecular level description of fibrinogen displacement. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 42, p. 12782-12786, 2003.

JUTURU, V.; WU, J. C. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. **ChemBiochem**, v. 19, n. 1, p. 7-21, 2018.

KALIA, J. et al. From Foe to Friend: Using Animal Toxins to Investigate Ion Channel Function. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 1, p. 158-175, 2015.

KARBALAEI, M.; REZAEI, S. A.; FARSIANI, H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **J Cell Physiol**, 2020.

KASIMOVA, M. A.; GRANATA, D.; CARNEVALE, V. Voltage-Gated Sodium Channels: Evolutionary History and Distinctive Sequence Features. **Curr Top Membr**, v. 78, p. 261-86, 2016.

KIM, J. B. Channelopathies. **Korean J Pediatr**, v. 57, n. 1, p. 1-18, 2014.

KINI, R. M. Toxins in thrombosis and haemostasis: potential beyond imagination. **J Thromb Haemost**, v. 9 Suppl 1, p. 195-208, 2011.

KOMORI, Y. et al. Effect of bilineobin, a thrombin-like proteinase from the venom of common cantil (*Agkistrodon bilineatus*). **Toxicon**, v. 31, n. 3, p. 257-70, 1993.

KOZLOV, S. Animal toxins for channelopathy treatment. **Neuropharmacology**, 2017.

KUANG, Q.; PURHONEN, P.; HEBERT, H. Structure of potassium channels. **Cell Mol Life Sci**, v. 72, n. 19, p. 3677-93, 2015.

LALOR, F. et al. Sustainability in the biopharmaceutical industry: Seeking a holistic perspective. **Biotechnol Adv**, v. 37, n. 5, p. 698-707, 2019.

LAWSON, R. et al. Phylogeny of the Colubroidea (Serpentes): new evidence from mitochondrial and nuclear genes. **Mol Phylogenet Evol**, v. 37, n. 2, p. 581-601, 2005.

LEE, J. W. et al. Purification and characterization of brevinase, a heterogeneous two-chain fibrinolytic enzyme from the venom of Korean snake, *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 260, n. 3, p. 665-70, 1999.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 10, p. 790-802, 2003.

LI, A. et al. Cloning, expression, purification and bioactivity evaluation of a thrombin-like enzyme from *Deinagkistrodon acutus* venom gland library. **Biotechnol Lett**, v. 40, n. 1, p. 93-102, 2018.

LI, Z. F. et al. [Recombinant batroxobin expressed highly in *Pichia pastoris*]. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 23, n. 3, p. 483-6, 2007.

LIM, B. B. et al. Molecular basis of fibrin clot elasticity. **Structure**, v. 16, n. 3, p. 449-59, 2008.

LIU, C.; LI, T.; CHEN, J. Role of High-Throughput Electrophysiology in Drug Discovery. **Curr Protoc Pharmacol**, v. 87, n. 1, p. e69, 2019.

LONG, S. B.; CAMPBELL, E. B.; MACKINNON, R. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. **Science**, v. 309, n. 5736, p. 903-8, 2005.

LORD, S. T. Fibrinogen and fibrin: scaffold proteins in hemostasis. **Curr Opin Hematol**, v. 14, n. 3, p. 236-41, 2007.

LORINCZI, E. et al. Voltage-dependent gating of KCNH potassium channels lacking a covalent link between voltage-sensing and pore domains. **Nature Communications**, v. 6, 2015.

LOVE, K. R.; DALVIE, N. C.; LOVE, J. C. The yeast stands alone: the future of protein biologic production. **Curr Opin Biotechnol**, v. 53, p. 50-58, 2018.

LUIZ, A. P.; WOOD, J. N. Sodium Channels in Pain and Cancer: New Therapeutic Opportunities. **Adv Pharmacol**, v. 75, p. 153-78, 2016.

MACKESSY, S. P. **Handbook of venoms and toxins of reptiles**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2010. xvi, 521 p., 8 p. of plates ISBN 9780849391651 (alk. paper).

MAIER, K. E.; RUSCONI, C. P.; LEVY, M. To PEGylate or Not To PEGylate Therapeutics? **Cell Chem Biol**, v. 26, n. 5, p. 615-616, 2019.

MORROW, J. F. et al. Replication and transcription of eukaryotic DNA in Escherichia coli. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 71, n. 5, p. 1743-7, 1974.

MOUHAT, S. et al. Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 24, p. 2503-18, 2008.

MULLARD, A. 2020 FDA drug approvals. **Nat Rev Drug Discov**, v. 20, n. 2, p. 85-90, 2021.

MUNAWAR, A. et al. Snake Venom Peptides: Tools of Biodiscovery. **Toxins (Basel)**, v. 10, n. 11, 2018.

MURPHY, R. W., J. FU, A. LATHROP, J.V. FELTHAM, V. KOVAC. Biology of the Vipers. 2002.

NORTON, R. S.; CHANDY, K. G. Venom-derived peptide inhibitors of voltage-gated potassium channels. **Neuropharmacology**, v. 127, p. 124-138, 2017.

OLIVEIRA, I. S. et al. Global proteomic and functional analysis of *Crotalus durissus collilineatus* individual venom variation and its impact on envenoming. **J Proteomics**, v. 191, p. 153-165, 2019.

OSHIMA-FRANCO Y, H. S., PRADO-FRANCESCHI J, CRUZ-HÖFLING MA, RODRIGUES-SIMIONI L. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin. **Toxicon**, v. 37, p. 16, 1998.

OSHIMA-FRANCO, Y. et al. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin. **Toxicon**, v. 37, n. 10, p. 1341-57, 1999.

OVERBEY, D. M.; JONES, E. L.; ROBINSON, T. N. How hemostatic agents interact with the coagulation cascade. **AORN J**, v. 100, n. 2, p. 148-59, 2014.

OZTURK-ATAR, K.; EROGLU, H.; CALIS, S. Novel advances in targeted drug delivery. **J Drug Target**, v. 26, n. 8, p. 633-642, 2018.

PEIGNEUR, S. et al. Crotonamine pharmacology revisited: novel insights based on the inhibition of KV channels. **Mol Pharmacol**, v. 82, n. 1, p. 90-6, 2012.

PEIGNEUR, S.; TYTGAT, J. Toxins in Drug Discovery and Pharmacology. **Toxins (Basel)**, v. 10, n. 3, 2018.

PINEDA, C. et al. Assessing the Immunogenicity of Biopharmaceuticals. **BioDrugs**, v. 30, n. 3, p. 195-206, 2016.

PRADNIWAT, P.; ROJNUCKARIN, P. Snake venom thrombin-like enzymes. **Toxin Reviews**, v. 33(1-2), p. 16-22, 2014.

_____. The structure-function relationship of thrombin-like enzymes from the green pit viper (*Trimeresurus albolabris*). **Toxicon**, v. 100, p. 53-9, 2015.

RIEDEL, T. et al. Fibrinopeptides A and B release in the process of surface fibrin formation. **Blood**, v. 117, n. 5, p. 1700-1706, 2011.

ROBERTS, M. J.; BENTLEY, M. D.; HARRIS, J. M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54, n. 4, p. 459-76, 2002.

ROY, J. et al. Pharmacological separation of hEAG and hERG K⁺ channel function in the human mammary carcinoma cell line MCF-7. **Oncol Rep**, v. 19, n. 6, p. 1511-6, 2008.

RUDY, B.; MCBAIN, C. J. Kv3 channels: voltage-gated K⁺ channels designed for high-frequency repetitive firing. **Trends Neurosci**, v. 24, n. 9, p. 517-26, 2001.

RYU, J. K.; KIM, H. S.; NAM, D. H. Current status and perspectives of biopharmaceutical drugs. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 5, p. 900-911, 2012.

SAMPAIO, S. C. et al. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1045-60, 2010.

SANTOS, J. H. P. M. et al. Protein PEGylation for the design of biobetters: from reaction to purification processes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, 2018.

SANZ, L. et al. Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. **J Proteomics**, v. 71, n. 1, p. 46-60, 2008.

SAUNA, Z. E. et al. Evaluating and Mitigating the Immunogenicity of Therapeutic Proteins. **Trends Biotechnol**, 2018.

SCHELLEKENS, H. Immunogenicity of therapeutic proteins clinical implications and future perspectives. **Clinical Therapeutics**, v. 24, n. 11, p. 20, 2002.

_____. Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins. **Nephrol Dial Transplant**, v. 20 Suppl 6, p. vi3-9, 2005.

SERRANO, S. M.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115-32, 2005.

SHIEH, C. C. et al. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 4, p. 557-94, 2000.

STAVROS, F. et al. Characterization of structure and function of ZS-9, a K⁺ selective ion trap. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114686, 2014.

STEVENS, M.; PEIGNEUR, S.; TYTGAT, J. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. **Frontiers in Pharmacology**, v. 2, 2011.

STRYJEWSKA, A. et al. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. **Pharmacol Rep**, v. 65, n. 5, p. 1075-85, 2013.

TAVARES, N. U. et al. Factors associated with low adherence to medicine treatment for chronic diseases in Brazil. **Rev Saude Publica**, v. 50, n. suppl 2, p. 10s, 2016.

THAKOR, P. et al. Polymer-drug conjugates: recent advances and future perspectives. **Drug Discov Today**, v. 25, n. 9, p. 1718-1726, 2020.

TIAN, C. et al. Potassium channels: structures, diseases, and modulators. **Chem Biol Drug Des**, v. 83, n. 1, p. 1-26, 2014.

UETZ, P.; HOŠEK, J.; HALLERMANN, J. **The reptile database** 2016.

VANDERLAAN, M. et al. Changes in Manufacturing Processes of Biologic Therapies Can Alter the Immunogenicity Profile of the Product. **Clin Pharmacol Ther**, v. 107, n. 4, p. 988-993, 2020.

VERONESE, F. M.; MERO, A. The impact of PEGylation on biological therapies. **BioDrugs**, v. 22, n. 5, p. 315-29, 2008.

WALLACE, J. L.; GOW, I. F.; WARNOCK, M. The life and death of breast cancer cells: proposing a role for the effects of phytoestrogens on potassium channels. **J Membr Biol**, v. 242, n. 2, p. 53-67, 2011.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 9, p. 917-24, 2010a.

_____. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. **Drug Discov Today**, v. 15, n. 17-18, p. 773-80, 2010b.

_____. Biopharmaceutical benchmarks 2014. **Nat Biotechnol**, v. 32, n. 10, p. 992-1000, 2014.

WAN, X. et al. Effect of protein immunogenicity and PEG size and branching on the anti-PEG immune response to PEGylated proteins. **Process Biochemistry**, v. 52, p. 183-191, 2017.

WANG, W.; MACKINNON, R. Cryo-EM Structure of the Open Human Ether-a-go-go-Related K(+) Channel hERG. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 422-430 e10, 2017.

WATANABE, E. et al. Na(v)2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 20, p. 7743-7751, 2000.

WHICHER, J. R.; MACKINNON, R. Structure of the voltage-gated K(+) channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism. **Science**, v. 353, n. 6300, p. 664-9, 2016.

WOHLRAB, J. [Basics of the pharmacology of biopharmaceuticals]. **Hautarzt**, v. 70, n. 12, p. 926-933, 2019.

WOLBINK, G. J.; AARDEN, L. A.; DIJKMANS, B. A. Dealing with immunogenicity of biologicals: assessment and clinical relevance. **Curr Opin Rheumatol**, v. 21, n. 3, p. 211-5, 2009.

WULFF, H.; CASTLE, N. A.; PARDO, L. A. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 12, p. 982-1001, 2009.

WULFF, H. et al. Antibodies and venom peptides: new modalities for ion channels. **Nat Rev Drug Discov**, v. 18, n. 5, p. 339-357, 2019.

YANG, D. P. et al. Expression, purification and characterization of Gloydus shedaoensis venom glosedobin as Hsp70 fusion protein in Pichia pastoris. **Protein Expression and Purification**, v. 66, n. 2, p. 138-142, 2009.

YELLEN, G. The moving parts of voltage-gated ion channels. **Q Rev Biophys**, v. 31, n. 3, p. 239-95, 1998.

YONAMINE, C. M. et al. Kinetic characterization of gyroxin, a serine protease from Crotalus durissus terrificus venom. **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2791-3, 2012.

YONAMINE, C. M. et al. Cloning of serine protease cDNAs from Crotalus durissus terrificus venom gland and expression of a functional Gyroxin homologue in COS-7 cells. **Toxicon**, v. 54, n. 2, p. 110-20, 2009.

YUAN, S. et al. [Expression of snake venom thrombin-like enzyme calobin in Pichia pastoris]. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 25, n. 4, p. 526-32, 2009.

ZAKLYAZMINSKAYA, E.; DZEMESHKEVICH, S. The role of mutations in the SCN5A gene in cardiomyopathies. **Biochim Biophys Acta**, v. 1863, n. 7 Pt B, p. 1799-805, 2016.

ZHANG, L. et al. The strategies and techniques of drug discovery from natural products. **Pharmacol Ther**, p. 107686, 2020.

ZHANG, S. T. et al. Co-overexpression of PpPDI enhances secretion of ancrod in Pichia pastoris. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 164, n. 7, p. 1037-47, 2011.