

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 22/02/2018.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



ESTUDOS ESTRUTURAIS DE COMPLEXOS ENTRE
FOSFOLIPASES A₂ HOMÓLOGAS ISOLADAS DO VENENO DE
Bothrops moojeni E INIBIDORES DA ATIVIDADE MIOTÓXICA

GUILHERME HENRIQUE MARCHI SALVADOR

BOTUCATU – SP

2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDOS ESTRUTURAIS DE COMPLEXOS ENTRE
FOSFOLIPASES A_2 HOMÓLOGAS ISOLADAS DO VENENO DE
Bothrops moojeni E INIBIDORES DA ATIVIDADE MIOTÓXICA

CANDIDATO: GUILHERME HENRIQUE MARCHI SALVADOR

ORIENTADOR: MARCOS ROBERTO DE MATTOS FONTES

CO-ORIENTADOR: JULIANA IZABEL DOS SANTOS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para a obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós
Graduação em Ciências Biológicas (Genética)

BOTUCATU – SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Salvador, Guilherme Henrique Marchi.

Estudos estruturais de complexos entre fosfolipases A2 homólogas isoladas do veneno de *Bothrops moojeni* e inibidores da atividade miotóxica / Guilherme Henrique Marchi Salvador. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes
Coorientador: Juliana Izabel dos Santos
Capes: 20901003

1. *Bothrops*. 2. Fosfolipases. 3. Serpente peçonhenta - Peçonha. 4. Animais venenosos. 5. Cristalografia de raios X.

Palavras-chave: *Bothrops moojeni*; Cristalografia de raios X; Fosfolipases A2 homólogas; Inibidores da atividade miotóxica; Venenos de serpentes.

*aos meu pais: Eliana e Prudente
aos meus irmãos Daniela e Luciano
à minha companheira Paula
ao meu amigo e orientador Marcos*

Agradecimentos

Ao meu orientador, Marcos Fontes, pela amizade e todas as palavras de sabedoria ditas e orientação profissional transmitidos durante estes anos de trabalho.

À Juliana, por sua ajuda e dedicação como co-orientadora, além de sua amizade e conselhos profissionais e pessoais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que financiou este projeto de pesquisa (Processo 2012/10830-8).

Ao CNPEM (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron) pela disposição das instalações para a realização dos experimentos de coleta de dados de difração de raios X.

Aos amigos do LBBC Guilherme, Letícia, Luiz Augusto, Márcio, Pedro, Rafael e Tahila por todos os momentos de descontração e ajuda neste e outros trabalhos.

Aos colegas e amigos do laboratório Andréa, Antoniel, Carlos, Eloah, Fábio, Fábio Matioli, Giovanna, Natália e Rafael por todas as trocas de conhecimento e pelos momentos de descontração.

Aos colegas Thiago R. Dreyer e Walter L. G. Cavalcante, pela colaboração nos experimentos apresentados neste trabalho, além da amizade e conselhos em meu caminho profissional.

Ao colega e amigo Lino F. de Lima, pela sua ajuda profissional nos experimentos de expressão de proteínas.

Aos meus queridos irmãos, Daniela (obrigado pelos conselhos pessoais e profissionais) e Luciano, que sua falta é indescritível.

À minha amada mãe, Eliana, por todo apoio dado durante esse e outros períodos importantes de minha vida e, em memória, ao meu amado pai Prudente.

À minha querida e amada companheira Paula, por todo apoio emocional e espiritual durante todos estes anos em que estamos juntos.

Estudos estruturais de complexos entre fosfolipases A₂ homólogas isoladas do veneno de *Bothrops moojeni* e inibidores da atividade miotóxica

Serpentes do gênero *Bothrops* representam cerca de 90% dos acidentes ofídicos que ocorrem no Brasil. Um componentes presente em venenos de serpentes são as fosfolipases A₂ (PLA₂S), que podem apresentar diversas atividades biológicas. Diversos estudos com PLA₂S e PLA₂S-homólogas de venenos de serpentes buscam melhor compreender o mecanismo da ação miotóxica, sugerindo diferentes sítios de ação. Neste trabalho, são apresentados estudos com PLA₂S-homólogas do veneno de *Bothrops moojeni*, conhecida popularmente como caíçaca. A miotoxina II (MjTX-II) foi estudada na forma nativa, complexada com ácidos graxos e os inibidores ácido rosmarínico e suramina, enquanto a miotoxina I (MjTX-I) foi estudada em complexo com o ligante suramina. Para a obtenção dos dados, foram utilizadas diferentes técnicas biofísicas como espalhamento dinâmico de luz, calorimetria por titulação isotérmica e cristalografia de raios X. Estes estudos foram complementados com estudos funcionais por técnicas miográficas e estudos computacionais por dinâmica molecular realizados por outros membros do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural. As estruturas cristalográficas da MjTX-II nativa e complexada com ácidos graxos revelaram particularidades para esta toxina, como a independência da ligação de ácidos graxos na estrutura para a sua ativação - alinhamento dos resíduos importantes para a atividade miotóxica. A estrutura da MjTX-II com o ácido rosmarínico revelou que o ligante interage com uma das regiões relacionada com a atividade miotóxica da toxina, o que possivelmente explica a inibição da atividade miotóxica da toxina por técnicas miográficas e está de acordo com mecanismo previamente proposto. Dados cristalográficos do complexo MjTX-II/suramina mostram que há duas moléculas inibidoras interagindo com os sítios relacionados a atividade miotóxica da proteína, o que auxilia na formação de um oligômero induzido pela molécula inibidora corroborando com outros experimentos biofísicos e funcionais. A estrutura cristalográfica do complexo MjTX-I/suramina foi obtida a alta resolução, mostrando mudança oligomérica da forma tetramérica (nativa) para a forma dimérica, com a presença do ligante entre os monômeros, corroborando com dados de calorimetria obtidos.

Palavras-chave: Venenos de serpentes; fosfolipases A₂ homólogas; *Bothrops moojeni*; inibidores da atividade miotóxica; cristalografia de raios X.

Structural studies of complex between phospholipases A₂ homologues isolated from *Bothrops moojeni* venom and myotoxic activity inhibitors

Bothrops genus represents approximately 90% of the ophidian accidents that occur in Brazil. One of the compounds of the venom is the phospholipases A₂ (PLA₂s), which are proteins with a wide range of biological activities. Several studies with PLA₂s and PLA₂-homologues from snake venom were performed to better understanding the myotoxic mechanism, suggesting different activity sites. This work presents studies with PLA₂s-homologues isolated from *Bothrops moojeni*, known in Brazil as caíçaca. The myotoxin II (MjTX-II) was studied in native, complexes to fatty acids, rosmarinic acid and suramin inhibitors. Myotoxin I (MjTX-I) was studied complexed to suramin. X-ray crystallography, dynamic light scattering and isothermal titration calorimetry were used to characterize the protein and complexes. Furthermore, functional studies by myographic techniques and computational studies using molecular dynamics were performed by other members of the Laboratory. Crystallographic structures of MjTX-II in native form and complexes to fatty acids reveals particularities for these toxin, such as the independence of the fatty acids binding for myotoxic residues alignment. The structure of MjTX-II complexed to rosmarinic acid showed that this ligand interact to a of regions related to myotoxic activity of toxin, which probably explaining its inhibitory action demonstrated by myographic techniques and is according to previous proposed mechanism. Crystallographic data of the MjTX-II/suramin complex shows two inhibitor molecules interacting to toxin surface, inducing its oligomerization and corroborating with other biophysical experiments. In contrast, MjTX-I/suramin complex crystal structure displayed an oligomeric change from the tetrameric (native) to dimeric structure.

Keywords: Snake venom; phospholipases A₂ homologue; *Bothrops moojeni*; myotoxic activity inhibitor; X-ray crystallography

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Acidentes Ofídicos	10
1.2. Fosfolipases A₂ e Fosfolipases A₂ homólogas	10
1.3. Moléculas inibidoras da mionecrose	13
1.4. <i>Bothrops moojeni</i> e miotoxinas I e II	14
2. OBJETIVOS	16
3. MÉTODOS	18
3.1. Purificação das toxinas	19
3.2. Estudos funcionais	19
3.3. Espalhamento de Luz Dinâmico	20
3.4. Cromatografia de exclusão molecular analítica	22
3.5. Calorimetria de Titulação Isotérmica	22
3.6. Experimentos de Dinâmica Molecular	24
3.7. Ensaio de cristalização	25
3.8. Coleta de dados de difração de raios X	27
3.9. Processamento e refinamento dos dados	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Purificação das toxinas MjTX-I e MjTX-II	31
4.2. Estudos com a MjTX-II nativa e dos complexos MjTX-II/ácidos graxos	33
<i>4.2.1. Papel dos ácidos graxos na estrutura da MjTX-II e nas Lys49PLA₂s e evidências estruturais para a independência de ácido graxo para a ativação da MjTX-II</i>	37
4.3. Complexo da MjTX-II com o inibidor ácido rosmarínico	41
4.4. Complexo MjTX-II/suramina	48
<i>4.4.1. Oligomerização da estrutura da MjTX-II/suramina</i>	48
<i>4.4.2. Evidências estruturais para a inibição da MjTX-II pela suramina</i>	56
4.5. Complexo da toxina MjTX-I com o ligante suramina	60
<i>4.5.1. Bases estruturais para a inibição da MjTX-I pela suramina</i>	67
4.6. Inibição das PLA₂s homólogas por diferentes moléculas	69
5. CONCLUSÃO	71
<i>5.1. Perspectivas futuras</i>	73

6. REFERÊNCIAS	74
7. ANEXOS	80
7.1. Produção da toxina PrTX-I na forma recombinante	81
7.2. Artigos publicados em periódicos no período de doutorado	90

Lista de Figuras

Figura 1: Duas possíveis conformações de dímeros na rede cristalina das Lys49-PLA ₂ s.	12
Figura 2: Compostos inibidores da atividade miotóxica.	14
Figura 3: Esquema simplificado do funcionamento de um equipamento de DLS.	21
Figura 4: Representação esquemática do experimento de microcalorimetria.	23
Figura 5: Esquema representativo dos métodos de difusão de vapor.	26
Figura 6: Modo em que o cristal é colocado ao <i>loop</i> de <i>nylon</i> .	27
Figura 7: Figura esquemática que representa o processo da coleta de dados por difração de raios X.	28
Figura 8: Cromatograma do veneno bruto de <i>B. moojeni</i> em troca iônica e gel de poliacrilamida a 13 % das frações correspondentes as toxinas de interesse.	31
Figura 9: Cromatograma dos picos correspondentes à MjTX-I e MjTX-II submetidos a fase reversa e gel de poliacrilamida a 13%.	31
Figura 10: Monocristais de MjTX-II nativa e crescidos na presença de ácidos graxos.	33
Figura 11: Estruturas cristalográficas da MjTX-II nativa e dos complexos MjTX-II/ácidos graxos e os respectivos mapas de densidade eletrônica dos ligantes.	36
Figura 12: Alinhamento de sequências de aminoácidos das Lys49-PLA ₂ s do gênero <i>Bothrops</i> com estruturas cristalográficas conhecidas.	37
Figura 13: Alteração estrutural que modifica a região da ligação Tyr119-Tyr119.	38
Figura 14: Ligações de hidrogênio Tyr119A-Tyr119B.	39
Figura 15: Localização dos íons sulfatos nas estruturas cristalográficas das Lys49-PLA ₂ s.	40
Figura 16: Gráfico que representa a amplitude das contrações de forma indireta.	41
Figura 17: Titulação calorimétrica de ácido rosmarínico em MjTX-II.	42
Figura 18: Monocristais do complexo MjTX-II/AR crescidos na temperatura de 18 °C.	43
Figura 19: Estrutura cristalográfica da MjTX-II/AR.	45
Figura 20: Estrutura cristalográfica das Lys49-PLA ₂ s complexadas com AR.	46
Figura 21: Interação da molécula de ácido rosmarínico na estrutura da MjTX-II.	47

Figura 22: Sobreposição das estruturas cristalográficas representadas em <i>ribbons</i> .	47
Figura 23: Gráfico que demonstra a amplitude das contrações.	48
Figura 24: Monocristais do complexo MjTX-II/suramina crescidos na temperatura de 18 °C.	49
Figura 25: Estrutura cristalográfica do complexo MjTX-II/suramina.	51
Figura 26: Interação das moléculas de suramina na estrutura da MjTX-II.	52
Figura 27: Média do RMSD dos carbonos alfa das cadeias principais do complexo tetramérico da MjTX-II.	53
Figura 28: Titulação calorimétrica de suramina em MjTX-II.	54
Figura 29: Análise da conformação oligomérica da MjTX-II/suramina por cromatografia de exclusão molecular analítica.	55
Figura 30: Sítios MDoS (sítio catiônico de docagem na membrana) e MDiS (sítio hidrofóbico para a ruptura da membrana) na estrutura da MjTX-II/suramina, onde estão destacados a molécula inibidora nestes sítios.	58
Figura 31: Sobreposição das estruturas de MjTX-II e Ecarpholina S/suramina.	59
Figura 32: Monocristais de MjTX-I/suramina.	60
Figura 33: Estrutura cristalográfica da MjTX-I/suramina.	61
Figura 34: Titulação calorimétrica de suramina em MjTX-I.	63
Figura 35: Interação da molécula de suramina na estrutura da MjTX-I.	64
Figura 36: Região destacada da interação entre os resíduos de número 119.	65
Figura 37: Alinhamento das sequências de aminoácidos das Lys49-PLA ₂ s isoladas do veneno de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> .	66
Figura 38: Estrutura cristalográfica da MjTX-I e a superfície de cargas.	67
Figura 39: Sobreposição dos complexos MjTX-I/suramina e BaspTX-II/suramina.	68
Figura 40: Estruturas de PLA ₂ s complexadas com suramina e os locais de interação com estas proteínas.	69

Lista de Tabelas

Tabela 1: Soluções precipitantes para os cristais obtidos no trabalho.	27
Tabela 2: Estatísticas de coleta de dados e refinamentos estruturais das estruturas da MjTX-II nativa e dos complexos MjTX-II/AG.	34
Tabela 3: Estatísticas de coleta de dados e refinamento da estrutura do complexo MjTX-II/AR.	44
Tabela 4: Estatísticas de coleta de dados e refinamento estrutural do complexo MjTX-II/suramina.	50
Tabela 5: Parâmetros termodinâmicos globais e específicos da titulação MjTX-II/suramina	54
Tabela 6: Estatísticas de coleta de dados e refinamento estrutural do complexo MjTX-I/suramina.	62
Tabela 7: Dados termodinâmicos intrínsecos da interação entre suramina e MjTX-I.	63

Abreviaturas

AG: Ácidos graxos compostos por diferentes quantidades de carbonos em sua cadeia

AR: Ácido rosmarínico

BthTX-I: Bothropstoxina I, Lys49-PLA₂ isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*

CD: Dicroísmo circular

DLS: Espalhamento de Luz Dinâmico

ITC: Calorimetria de Titulação Isotérmica

Lys49-PLA₂s: Fosfolipases A₂ miotóxicas sem atividade catalítica que possuem um resíduo de lisina na posição 49

MDiS: Sítio de desestabilização da membrana (*Membrane Disruption Site*)

MDoS: Sítio de ancoragem à membrana (*Membrane Docking Site*)

MjTX-I: Miotoxina I, Lys49-PLA₂ isolada do veneno de *Bothrops moojeni*

MjTX-II: Miotoxina II, Lys49-PLA₂ isolada do veneno de *Bothrops moojeni*

PEG: Polietilenoglicol

PDB: *Protein Data Bank*

PLA₂: Fosfolipases A₂

PrTX-I: Piratoxina I, Lys49-PLA₂ isolada do veneno de *Bothrops pirajai*

R_h: Raio Hidrodinâmico

RMSD: Desvio da raiz quadrática média

SAXS: Espalhamento de raios X a baixo ângulo

SDS: Sodium dodecyl sulfate

INTRODUÇÃO

1.1. Acidentes ofídicos

Acidentes causados por animais peçonhentos representam um importante problema de saúde pública, principalmente em áreas rurais de países da Ásia, África e América Latina. Geralmente, os acidentes causados por serpentes peçonhentas causam maior número de mortes que outras doenças negligenciadas como a dengue hemorrágica, cólera, leishmaniose, esquistossomose e doença de Chagas, despertando assim, a atenção da comunidade científica que ultimamente vem publicando trabalhos científicos de alto impacto nesta área e também levando Organização Mundial de Saúde (OMS) a classificar os acidentes ofídicos como uma doença negligenciada (Kasturiratne *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2010).

Na América Latina, o gênero de serpente que causa o maior número de acidentes ofídicos (cerca de 85%) é o *Bothrops* (Gutierrez e Lomonte, 1995; Kasturiratne *et al.*, 2008; De Oliveira, 2009), onde o principal efeito causado neste acidente é a mionecrose, resultante principalmente do sinergismo de diferentes componentes do veneno, incluindo metaloproteases hemorrágicas que induzem isquemia da área afetada e fosfolipases A₂ homólogas miotóxicas, as quais promovem citotoxicidade direta em células musculares (Gutierrez *et al.*, 2009). Este efeito local não é eficientemente neutralizado pelos soros antiofídicos disponíveis, podendo levar a perda permanente de tecido, amputação e deficiência física das vítimas (Otero *et al.*, 2002; Lomonte *et al.*, 2003).

1.2. Fosfolipases A₂ e Fosfolipases A₂ homólogas

Fosfolipases A₂ (PLA₂s, E.C. 3.1.1.4) são enzimas cálcio-dependentes que podem participar de diversos processos fisiológicos, como o remodelamento de membranas, mediação de processos inflamatórios e digestão de fosfolipídios (Moreira *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2004). Além disso, esta classe de proteínas pode ser encontrada de forma abundante em venenos de artrópodes (insetos) e répteis (lagartos e serpentes) (Arni e Ward, 1996; Ownby *et al.*, 1999). As PLA₂s (incluindo as toxinas apresentadas neste trabalho) apresentam sete pontes dissulfeto e também os seguintes elementos de estrutura secundária: N-terminal com hélice- α (h1), uma hélice curta, o *loop* de ligação do íon cálcio, duas hélices- α (h2 e h3), uma folha β formada por duas fitas anti-paralelas (conhecidas também como β -wings) e o *loop* C-terminal (Arni e Ward, 1996; Magro *et al.*, 2009).

Além das PLA₂, podem também estar presentes nos venenos de serpentes outras proteínas com semelhanças estruturais em relação às PLA₂, porém cataliticamente inativas. Estas proteínas conhecidas como PLA₂s-homólogas ou PLA₂-like apresentam mutações

típicas nos resíduos da posição 49 (Lys49, Ser49 ou Arg49), sendo então conhecidas como Lys49-PLA₂s, Ser49-PLA₂s ou Arg49-PLA₂s. Em serpentes do gênero *Bothrops*, encontram-se as Lys49-PLA₂s, que são caracterizadas por serem cataliticamente inativas, pois a ligação do íon Ca⁺² no seu sítio ativo é impedida por vários fatores estruturais, como por exemplo as mutações naturais dos resíduos Asp49→Lys e Tyr28→Asn (Holland *et al.*, 1990; Fernandes *et al.*, 2010). Estas toxinas possuem a estrutura terciária semelhante às das PLA₂s catalíticas, porém suas diferentes funções podem estar associadas com a diferença na conformação oligomérica e sítios funcionais (Dos Santos *et al.*, 2009; Dennis *et al.*, 2011; Gutierrez *et al.*, 2013; Salvador, Fernandes, *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2014).

Diferentes técnicas biofísicas demonstram que as Lys49-PLA₂s são proteínas diméricas em solução (Da Silva Giotto *et al.*, 1998; Arni *et al.*, 1999; Soares, Guerra-Sa, *et al.*, 2000; Murakami *et al.*, 2007b; Fernandes *et al.*, 2013; Salvador, Cavalcante, *et al.*, 2013), porém, pode-se observar duas possibilidades de dímeros na rede cristalina destas toxinas, as quais foram denominadas "dímero convencional" e "dímero alternativo" (Figura 1). Inicialmente, a conformação dimérica convencional era adotada para a resolução destas estruturas, porém, em 2005, Murakami e colaboradores apresentaram a estrutura cristalográfica da BaspTX-II (toxina isolada do veneno de *B. asper*) co-cristalizada com o inibidor suramina, sendo que a configuração dimérica alternativa apresenta ser o único modo em que o inibidor poderia interagir com os dois monômeros sem ficar exposto ao solvente. Além disso, as estruturas da PrTX-I (toxina isolada do veneno de *B. pirajai*) e BthTX-I (toxina isolada do veneno de *B. jararacussu*) elucidadas por cristalografia na presença de α -tocoferol (vitamina E), também demonstraram que a interação entre o ligante e os dois monômeros da proteína era energeticamente mais favorável quando estas se encontrava na forma alternativa (Dos Santos *et al.*, 2009). Em 2007, Murakami e colaboradores também mostraram que a conformação alternativa é mais bem ajustada ao envelope protéico obtido por experimentos de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) com a toxina BthTX-I. Além destes dados, a análise para a melhor configuração oligomérica para Lys49-PLA₂s utilizando-se o programa *online* PDB e PISA (Krissinel e Henrick, 2007), indicou que a conformação dimérica alternativa apresenta maior área de interface e valores de energia livre mais favoráveis (Dos Santos *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2010).

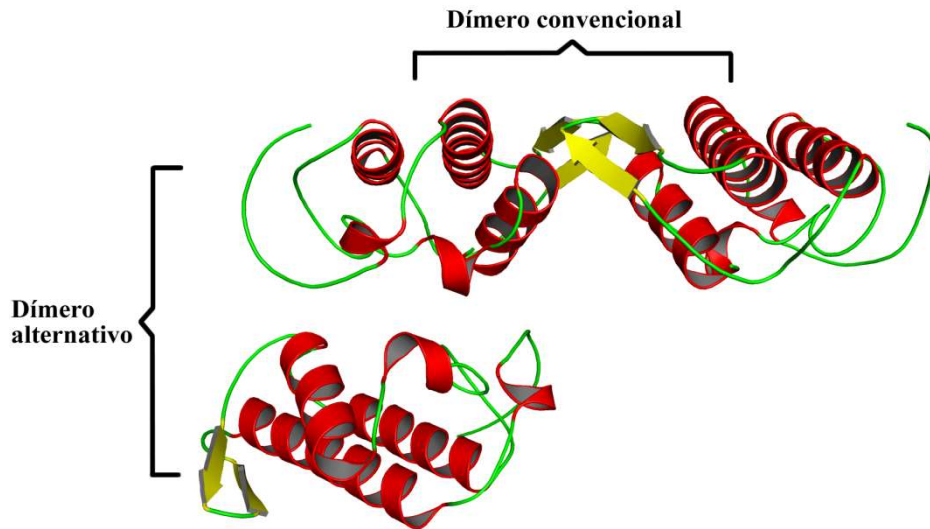


Figura 1: Duas possíveis conformações de dímeros na rede cristalina das Lys49-PLA₂s. As regiões em vermelho representam as hélices- α , em amarelo as folhas β e os *loops* são representados em verde.

Algumas possíveis regiões envolvidas no mecanismo miotóxico das Lys49-PLA₂s vem sendo destacadas por vários autores ao longo dos anos (Arni e Ward, 1996; Dos Santos *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2014), como por exemplo, a região C-terminal (chamado também anteriormente de sítio de ligação de heparina - resíduos 115-129), que estaria envolvida com o mecanismo miotóxico em colaboração com aminoácidos de caráter básico (lisinas e argininas) de outras regiões da proteínas formando um sítio de ação catiônico (Lomonte *et al.*, 1994; Kini, 2003).

Em 2009, dos Santos e colaboradores destacaram uma porção básica na estrutura das Lys49-PLA₂s, que era composto por uma lisina do N-terminal (Lys20) e outros dois resíduos do C-terminal, sendo uma lisina (Lys115) e uma arginina (Arg118), onde esta região foi denominada "sítio miotóxico". Foi observada a interação de íons sulfato nesta região em várias estruturas, onde estes íons se assemelham a cabeças de fosfolípidos (Bahnsen, 2005), propondo este local como o sítio de interação destas toxinas com a membrana. Porém, para o alinhamento e correta posição destes resíduos para a ação da toxina, estes mesmos autores sugeriram que a toxina deveria estar na forma ativa, ou seja, à partir da entrada de um substrato no canal hidrofóbico da toxina e na conformação de "dímero alternativo" (Murakami *et al.*, 2007b; Dos Santos *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2014).

Posteriormente, Fernandes e colaboradores em 2013 (Fernandes *et al.*, 2013) propuseram um complemento ao sítio miotóxico proposto em 2009. Nesta proposta, os autores sugerem que a região anteriormente chamada de "sítio miotóxico" seria a responsável pelo contato e ancoragem da toxina na membrana da célula muscular, passando então a

denominar este sítio de “*Membrane Docking Site – MDoS*”, e também propondo a existência de uma região hidrofóbica da toxina composta pelos resíduos leucina (Leu121) e fenilalanina (Phe125) que seria a responsável pela ruptura da membrana, passando a denominar esta de “*Membrane disruption site – MDiS*”.

No ano de 2014, Fernandes e colaboradores (Fernandes *et al.*, 2014) propuseram um mecanismo completo para a ação das Lys49-PLA₂s, composto por cinco passos: 1º Entrada de um substrato (ácidos graxos e/ou estruturalmente, moléculas de PEG4000 – que podem simular ácidos graxos) no canal hidrofóbico da toxina; 2º Ativação alostérica da proteína, alinhando os aminoácidos do MDoS e MDiS para a ação da toxina; 3º Ligação da toxina na membrana através do MDoS; 4º Penetração da toxina pelo MDiS; 5º Morte celular.

1.3. Moléculas inibidoras da mionecrose

A busca por inibidores para proteínas com atividade mitotóxica (Lys49-PLA₂s por exemplo) têm sido muito intensa recentemente (De Oliveira *et al.*, 2003; Murakami *et al.*, 2005; Tieli *et al.*, 2005; Marcussi *et al.*, 2007; Murakami *et al.*, 2007a; Lomonte *et al.*, 2009; Dos Santos, Cardoso, *et al.*, 2011; Salvador *et al.*, 2015). O uso de plantas para fins medicinais e terapêutico já são validados cientificamente, pois várias plantas são usadas na medicina popular e contribui para a descoberta de várias drogas, como a morfina (anestésico alcalóide do ópio) e a rutina (potente vasodilatador) (Calixto *et al.*, 2000).

Sabe-se que várias espécies de plantas são usadas no tratamento contra envenenamento ofídico por comunidades que não possuem pronto acesso ao uso de soros anti-ofídicos (Soares *et al.*, 2005; Samy *et al.*, 2008). Como exemplo, um composto que demonstra atividade anti-ofídica é o ácido rosmarínico (AR – Figura 2A), que pode ser isolado do alecrim (*Rosmarinus officinalis*), pertencente da família *Lamiaceae* e da planta erva baleeira (*Cordia verbenacea*), pertencente à família *Boraginaceae*. Experimentos feitos com a incubação do AR e toxinas isoladas de venenos de serpentes mostraram que este composto pode possuir a propriedade de inibir a formação de edema e mitotoxicidade (Soares *et al.*, 2005; Tieli *et al.*, 2005).

Outro composto que também pode ser usado no tratamento da mionecrose causado por venenos de serpentes, é a suramina (8,8'-[carbonylbis [imino-3,1-phenylenecarbonylimino (4-methyl-3,1-phenylene) carbonylimino]] bis-1,3,5-naphthalenetrisulfonic acid hexasodium salt) (Figura 2B). Este composto polisulfonado sintético é altamente carregado negativamente e já é usado clinicamente no tratamento de

doenças causadas por parasitas, como a Tripanossomíase Africana e Oncocercose (Burch e Ashburn, 1951; Williamson e Desowitz, 1956; Cherry, 1960; Schneider, 1963; Murakami *et al.*, 2005). Alguns experimentos realizados com a suramina contra a ação de venenos de serpentes, mostraram que este composto pode inibir o bloqueio neuromuscular causado por neurotoxinas pré-sinápticas, como a crotoxina e β -bungarotoxina (Lin-Shiau e Lin, 1999) e prevenir a necrose muscular (Arruda *et al.*, 2002; De Oliveira *et al.*, 2003).

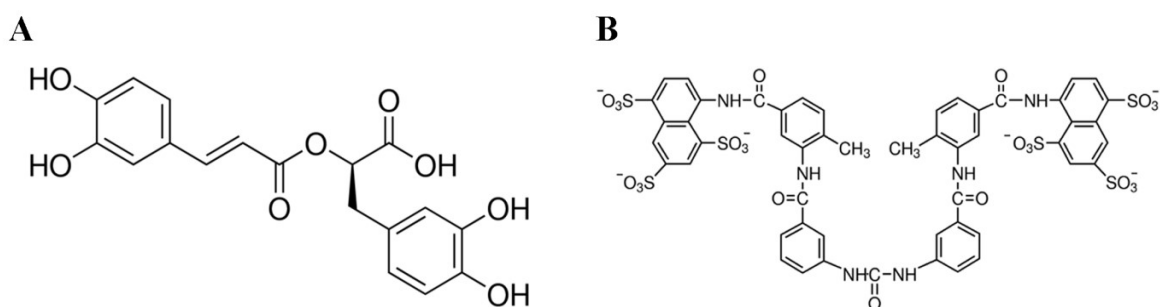


Figura 2: Compostos inibidores da atividade miotóxica. **A.** Ácido rosmarínico; **B.** Suramina.

Como estas moléculas auxiliam na inibição das atividades biológicas das toxinas, futuramente, podem ser usadas como complemento para a soroterapia convencional já usada em acidentes ofídicos (De Oliveira *et al.*, 2003; Murakami *et al.*, 2005; Ticli *et al.*, 2005; Marcussi *et al.*, 2007; Murakami *et al.*, 2007b; Lomonte *et al.*, 2009).

1.4. *Bothrops moojeni* e miotoxinas I e II

Serpentes do gênero *Bothrops* são representantes da subfamília Crotalinae e são de grande interesse científico, médico e social no Brasil, pois são responsáveis pela grande maioria dos acidentes ofídicos que ocorrem no país (Cardoso, 2003). Uma espécie representante deste gênero é a *Bothrops moojeni* a qual é popularmente conhecida como caíçaca e pode medir 1,5 m, além de apresentar comportamento bastante agressivo, o que aumenta sua importância biológica, sendo que esta espécie consegue se adaptar a vários ambientes, sendo a principal espécie de *Bothrops* do cerrado (grandes áreas de formação aberta que se estendem do Brasil central até o sul do estado do Paraná) (Hoge, 1965; Cardoso, 2003).

A miotoxina I (MjTX-I) é uma toxina isolada do veneno de *B. moojeni* e é uma PLA₂ homóloga (Lys49-PLA₂) que apresenta uma massa molecular de 13,737 kDa (forma reduzida) estimada pela sequência de aminoácidos. Esta proteína é composta por 121 aminoácidos e contém uma elevada proporção de resíduos básicos e hidrofóbicos, podendo

apresentar formas diméricas, triméricas e tetraméricas em solução (Soares, Andriao-Escarso, *et al.*, 2000; Salvador, Fernandes, *et al.*, 2013). Os efeitos farmacológicos da MjTX-I são similares aos das demais Lys49-PLA₂s, apresentando miotoxicidade, cardiotoxicidade, formação de edema, rompimento dos lipossomos e letalidade. A MjTX-I, na sua forma nativa, não apresenta diretamente atividades hemolíticas ou anticoagulante (Soares, Andriao-Escarso, *et al.*, 2000) e além disso, para exibir a mesma eficácia que outras Lys49-PLA₂s em estudos realizados em preparações de músculos, é necessária cinco vezes mais quantidade de toxina (Salvador, Fernandes, *et al.*, 2013). A estrutura cristalográfica nativa da MjTX-I é diferenciada das outras Lys49-PLA₂s por se apresentar tetramérica; além desta proteína destacar-se por não possuir alguns dos resíduos responsáveis pela atividade miotóxica recentemente sugerida para as Lys49-PLA₂s de serpentes do gênero *Bothrops* (Dos Santos *et al.*, 2009; Salvador, Fernandes, *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2014).

A miotoxina II (MjTX-II) é uma PLA₂ homóloga (Lys49-PLA₂) básica com massa molecular de 13,887 kDa (forma reduzida - estimada pela sequência de aminoácidos) composta por 122 resíduos. O ponto isoelétrico de 8,9 é próximo do valor de outras miotoxinas, como bothropstoxinas (Homsí-Brandeburgo *et al.*, 1988) e piratoxinas (Mancuso *et al.*, 1995). A toxina apresenta drástica indução de edema e necrose quando aplicada em concentração de 50 µg (Soares *et al.*, 1998). A estrutura da MjTX-II nativa apresenta-se como dímero, assim como a maioria das Lys49-PLA₂s depositadas no banco de dados, porém apresenta algumas particularidades no modo de interação de moléculas de ácido graxo e PEG4000 no canal hidrofóbico, possivelmente causado pela mutação Leu32Gly e a inserção do aminoácido Asn na posição 120, o que também pode alterar o modo de ligação de moléculas inibidoras nesta toxina (Salvador, Cavalcante, *et al.*, 2013).

Foram caracterizados por meio de estudos funcionais e estruturais as toxinas MjTX-I e MjTX-II com diferentes ligantes/inibidores, isoladas do veneno de *Bothrops moojeni*. Estas toxinas apresentam várias particularidades como mutações, diferenças na estrutura oligomérica e na potência da atividade miotóxica, que podem ser provenientes do processo de evolução sofrido pela serpente (Kini, 1997; 2003; Doley e Kini, 2009; Dos Santos, Cintra-Francischinelli, *et al.*, 2011). A MjTX-I, por exemplo, apresenta a estrutura nativa com diferente conformação oligomérica comparada com outras Lys49-PLA₂s (Marchi-Salvador *et al.*, 2005; Salvador, Fernandes, *et al.*, 2013) e atividade miotóxica significativamente baixa quando comparada com outras Lys49-PLA₂s (Andriao-Escarso *et al.*, 2000; Salvador, Fernandes, *et al.*, 2013). Já a MjTX-II apresenta uma inserção e algumas mutações na região do C-terminal, que alteram parcialmente o modo de interação dos ligantes nesta molécula (Salvador, Cavalcante, *et al.*, 2013).

Temos também que o modo de ativação e inibição da MjTX-II é diferenciado das outras Lys49-PLA₂s, pois a estrutura cristalográfica da toxina na forma nativa dispensa a presença de uma molécula de ácido graxo em seu canal hidrofóbico para a estabilização do dímero e para a ativação alostérica na toxina.

As moléculas de suramina e AR são potenciais inibidores para a atividade miotóxica causada pelas Lys49-PLA₂s de serpentes do gênero *Bothrops*. Primeiramente, as estruturas obtidas a alta resolução deram evidências do modo de inibição da atividade da toxina pelas moléculas de suramina e AR, pois se posicionaram nos sítios funcionais descritos anteriormente para estas toxinas: MDoS (suramina) e MDiS (suramina e AR). Além disso, foi possível observar por estudos de DLS que a molécula de suramina pode induzir a formação de complexos oligoméricos, ocasionando ocultação dos sítios funcionais em ambas toxinas (MjTX-I e MjTX-II).

Baseado nestas evidências, também pode ser proposto o uso das moléculas inibidoras estudadas aqui (suramina e AR) na forma clínica, a fim de se combater os efeitos de mionecrose local induzidos por Lys49-PLA₂s, os quais são possíveis complementos para o tratamento de soroterapia aplicado na ocorrência de acidentes ofídicos causados por serpentes do gênero *Bothrops*.

5.1. Perspectivas futuras

Ainda é necessária melhor análise da conformação oligomérica para os dados do complexo MjTX-I/suramina, onde que para o esclarecimento dos dados de ITC, DLS e estruturais seria interessante realizar experimentos de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS), que irá fornecer evidências sobre a conformação oligomérica da toxina em solução. Para os estudos dos complexos MjTX-II/AR e MjTX-II/ácidos graxos ainda é necessária uma análise mais aprofundada dos dados estruturais, pois ainda há dúvidas em relação ao mecanismo de ação da MjTX-II, já que as alterações estruturais observadas aqui são exclusivas para esta toxina até o momento. O processo de obtenção da PrTX-I de forma recombinante se encontra em fase avançada, bastando apenas aumentar a eficiência do processo de purificação e caracterizar a sequência, estruturalmente e funcionalmente a toxina.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 2, p. 213-21, Feb 2010.
- ANDRILAO-ESCARSO, S. H. et al. Myotoxic phospholipases A₂ in *bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 82, n. 8, p. 755-63, Aug 2000.
- ARNI, R. K. et al. Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*. **Arch Biochem Biophys**, v. 366, n. 2, p. 177-82, Jun 15 1999.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A₂-a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827-41, Aug 1996.
- ARRUDA, E. Z. et al. Effect of suramin on myotoxicity of some crotalid snake venoms. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 6, p. 723-6, Jun 2002.
- BAHNSON, B. J. Structure, function and interfacial allostereism in phospholipase A₂: insight from the anion-assisted dimer. **Arch Biochem Biophys**, v. 433, n. 1, p. 96-106, Jan 1 2005.
- BATTYE, T. G. et al. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 67, n. Pt 4, p. 271-81, Apr 2011.
- BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. **Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684-3690, 1984.
- BERENDSEN, H. J. C. P., J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; HERMANS, J. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In: PULLMAN, B. (Ed.). **Intermolecular Forces**. Dordrecht: D. Reidel Publishing Co., 1981. p.331-342.
- BORGSTAHL, G. E. O. How to Use Dynamic Light Scattering to Improve the Likelihood of Growing Macromolecular Crystals. In: DOUBLIÉ, S. (Ed.). **Macromolecular Crystallography Protocols**. Totowa: Humana Press Inc, v.1, 2007. p.109-129.
- BROWN, A. Analysis of cooperativity by isothermal titration calorimetry. **Int J Mol Sci**, v. 10, n. 8, p. 3457-77, Oct 2009.
- BRUNGER, A. T. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. **Nature**, v. 355, n. 6359, p. 472-5, Jan 30 1992.
- BURCH, T. A.; ASHBURN, L. L. Experimental therapy of onchocerciasis with suramin and hetrazan; results of a three-year study. **Am J Trop Med Hyg**, v. 31, n. 5, p. 617-23, Sep 1951.
- CALIXTO, J. B. et al. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytother Res**, v. 14, n. 6, p. 401-18, Sep 2000.
- CARDOSO, J. L. C. F., F. O. S.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. **Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos, Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.
- CAVALCANTE, W. L. et al. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **J Ethnopharmacol**, v. 112, n. 3, p. 490-7, Jul 25 2007.
- CAVALCANTE, W. L.; SILVA, M. D.; GALLACCI, M. Influence of temperature upon paralyzing and myotoxic effects of bothropstoxin-I on mouse neuromuscular preparations. **Chem Biol Interact**, v. 151, n. 2, p. 95-100, Jan 15 2005.
- CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 1, p. 12-21, Jan 2010.
- CHERRY, J. K. The treatment of onchocerciasis. **East Afr Med J**, v. 37, p. 550-8, Aug 1960.
- CREGG, J. M. **Methods in Molecular Biology 2nd ed**. New Jersey: Totowa. Humana Press. Pichia Protocols, 2007.
- DA SILVA GIOTTO, M. T. et al. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. **Proteins**, v. 30, n. 4, p. 442-54, Mar 1 1998.

- DE OLIVEIRA, M. et al. Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothropstoxin-I by suramin. **Toxicon**, v. 42, n. 4, p. 373-9, Sep 15 2003.
- DE OLIVEIRA, R. C. W. Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos. Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos envenenamentos. In: (Ed.). São Paulo: Sarvier, 2009. p.550.
- DEAZEVEDO, W. F. et al. Crystal structure of myotoxin-II: A myotoxic phospholipase A₂ - Homologue from *Bothrops moojeni* venom. **Protein and Peptide Letters**, v. 4, n. 5, p. 329-334, Oct 1997. ISSN 0929-8665.
- DENNIS, E. A. et al. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chem Rev**, v. 111, n. 10, p. 6130-85, Oct 12 2011.
- DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 17, p. 2851-71, Sep 2009.
- DOS SANTOS, J. I. et al. Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: new insights into Lys49-PLA₂ inhibition. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28521, 2011.
- DOS SANTOS, J. I. et al. Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A₂ class. **Proteins**, v. 79, n. 1, p. 61-78, Jan 2011.
- DOS SANTOS, J. I.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A₂ from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **J Struct Biol**, v. 167, n. 2, p. 106-16, Aug 2009.
- DRENTH, J. **Principles of Protein X-ray Crystallography**. New York: Springer-Verlag, 1994. 311.
- DUCRUIX, A. G., R. **Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A practical approach**. New York: Oxford University Press., 1992.
- EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126-32, Dec 2004.
- FERNANDES, C. A. et al. A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A₂-like proteins from viperid snake venoms. **Biochim Biophys Acta**, v. 1844, n. 12, p. 2265-2276, Sep 30 2014.
- FERNANDES, C. A. et al. Structural bases for a complete myotoxic mechanism: crystal structures of two non-catalytic phospholipases A₂-like from *Bothrops brazili* venom. **Biochim Biophys Acta**, v. 1834, n. 12, p. 2772-81, Dec 2013.
- FERNANDES, C. A. et al. Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA₂s. **J Struct Biol**, v. 171, n. 1, p. 31-43, Jul 2010.
- GALLACCI, M. et al. Paralyzing and myotoxic effects of a recombinant bothropstoxin-I (BthTX-I) on mouse neuromuscular preparations. **Exp Toxicol Pathol**, v. 57, n. 3, p. 239-45, Jan 2006.
- GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-24, Nov 1995.
- GUTIERREZ, J. M. et al. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 958-75, Dec 1 2009.
- GUTIERREZ, J. M. et al. Assessing the preclinical efficacy of antivenoms: from the lethality neutralization assay to antivenomics. **Toxicon**, v. 69, p. 168-79, Jul 2013.
- HELUANY, N. F. et al. Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon**, v. 30, n. 10, p. 1203-10, Oct 1992.
- HESS, B. et al. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 3, p. 435-447, Mar 2008.
- HOFMANN, A. Spectroscopic techniques: I Spectrophotometric techniques. In: WILSON, K. & WALKER J. (Ed.). **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**, Cambridge University Press, Cambridge, 2010.
- HOGUE, A. R. Preliminary account on neotropical Crotalinae (serpentes - Viperidae). **Mem. Inst. Butantan**, v. 32, p. 109-184, 1965.

- HOLLAND, D. R. et al. The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A₂ from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-Å resolution. **J Biol Chem**, v. 265, n. 29, p. 17649-56, Oct 15 1990.
- HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. et al. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 615-27, 1988.
- JANCARIK, J. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of the ligand-binding domain of the bacterial chemotaxis-mediating aspartate receptor of *Salmonella typhimurium*. **J Mol Biol**, v. 221, n. 1, p. 31-4, Sep 5 1991.
- KASTURIRATNE, A. et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med**, v. 5, n. 11, p. e218, Nov 4 2008.
- KELLY, S. M.; JESS, T.J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochim Biophys Acta**, 1751, p. 119-139, 2005.
- KINI, R. M. **Phospholipase A₂ enzyme: structure, function and mechanism**. Chichester: Wiley, 1997.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-40, Dec 15 2003.
- KOBE, B. G., T. TEH, T. HEIERHORST, J. K. Crystallization of protein kinases and phosphatases. In: HARDIE, D. G. (Ed.). **Protein phosphorylation: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1999. p.127-151.
- KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **J Mol Biol**, v. 372, n. 3, p. 774-97, Sep 21 2007.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970.
- LIN-SHIAU, S. Y.; LIN, M. J. Suramin inhibits the toxic effects of presynaptic neurotoxins at the mouse motor nerve terminals. **Eur J Pharmacol**, v. 382, n. 2, p. 75-80, Oct 8 1999.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERON, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 885-901, Dec 15 2003.
- LOMONTE, B. et al. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 1012-28, Dec 1 2009.
- LOMONTE, B. et al. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J Biol Chem**, v. 269, n. 47, p. 29867-73, Nov 25 1994.
- MAGRO, A. J. et al. Influence of quaternary conformation on the biological activities of the Asp49-phospholipases A₂s from snake venoms. **Protein Pept Lett**, v. 16, n. 8, p. 852-9, 2009. ISSN 1875-5305.
- MANCUSO, L. C. et al. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon**, v. 33, n. 5, p. 615-26, May 1995.
- MARCHI-SALVADOR, D. P. et al. Crystal structure of a phospholipase A₂ homolog complexed with p-bromophenacyl bromide reveals important structural changes associated with the inhibition of myotoxic activity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1794, n. 11, p. 1583-90, Nov 2009.
- MARCHI-SALVADOR, D. P. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of myotoxin I, a Lys49-phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni*. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, v. 61, n. Pt 10, p. 882-4, Oct 1 2005.
- MARCUSSI, S. et al. Snake venom phospholipase A₂ inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Curr Top Med Chem**, v. 7, n. 8, p. 743-56, 2007.
- MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **J Appl Crystallogr**, v. 40, n. Pt 4, p. 658-674, Aug 1 2007.
- MCPHERSON, A. **Crystallization of biological macromolecules**. Malabar: Krieger Publishing Company, 1989.
- MCPHERSON, A. **Introduction to Macromolecular Crystallography**. Hoboken: Wiley-Liss, 2003.

- MCREE, D. E. **Practical Protein Crystallography**. San Diego: Academic Press, 1993.
- MOREIRA, L. A. et al. Bee venom phospholipase inhibits malaria parasite development in transgenic mosquitoes. **J Biol Chem**, v. 277, n. 43, p. 40839-43, Oct 25 2002.
- MURAKAMI, M. T. et al. Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypansomal drug suramin. **J Mol Biol**, v. 350, n. 3, p. 416-26, Jul 15 2005.
- MURAKAMI, M. T. et al. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues. **Toxicon**, v. 49, n. 3, p. 378-87, Mar 1 2007a.
- MURAKAMI, M. T. et al. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues. **Toxicon**, v. 49, n. 3, p. 378-387, Mar 1 2007b.
- MURSHUDOV, G. N.; VAGIN, A. A.; DODSON, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 53, n. Pt 3, p. 240-55, May 1 1997. ISSN 0907-4449.
- NAVAZA, J. S., P. AMoRe: An Automated Molecular Replacement Program Package. In: CARTER, C. W. S., R. M. (Ed.). **Methods in Enzymology: Macromolecular Crystallography**. New York: Academic Press, v.276, 1997. p.581-593.
- OOSTENBRINK, C. et al. Validation of the 53A6 GROMOS force field. **Eur Biophys J**, v. 34, n. 4, p. 273-84, Jun 2005.
- OSHIMA-FRANCO, Y. et al. The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 95, n. 4, p. 175-82, Oct 2004.
- OTERO, R. et al. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1107-114, Aug 2002.
- OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Macromolecular Crystallography, Pt A**, v. 276, p. 307-326, 1997.
- OWNBY, C. L. et al. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v. 37, n. 3, p. 411-45, Mar 1999.
- PEROZZO, R.; FOLKERS, G.; SCAPOZZA, L. Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. **J Recept Signal Transduct Res**, v. 24, n. 1-2, p. 1-52, Feb 2004.
- PONCE-SOTO, L. A. et al. Neuromuscular activity of BaTX, a presynaptic basic PLA₂ isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, v. 150, n. 2, p. 291-297, Aug 2009.
- POTTERTON, L. et al. Developments in the CCP4 molecular-graphics project. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2288-94, Dec 2004.
- RANDAZZO-MOURA, P. et al. Structural characterization and neuromuscular activity of a new Lys49 phospholipase A₂ homologous (Bp-12) isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Protein J**, v. 27, n. 6, p. 355-62, Sep 2008.
- RODRIGUES, V. M. et al. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 305-14, Sep 1 2004.
- SALVADOR, G. H. et al. Structural and functional studies with myotoxin II from *Bothrops moojeni* reveal remarkable similarities and differences compared to other catalytically inactive phospholipases A₂-like. **Toxicon**, v. 72, p. 52-63, Sep 2013.
- SALVADOR, G. H. et al. Structural and phylogenetic studies with MjTX-I reveal a multi-oligomeric toxin-a novel feature in Lys49-PLA₂s protein class. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60610, 2013.
- SAMBROOK, J.; MACCALLUM, P.; RUSSEL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed**. New York: Cold Springs Harbour Press, 2001. 2344p.
- SAMY, R. P. et al. Ethnobotanical survey of folk plants for the treatment of snakebites in Southern part of Tamilnadu, India. **J Ethnopharmacol**, v. 115, n. 2, p. 302-12, Jan 17 2008.

- SCHEUERMANN, T. H.; BRAUTIGAM, C. A. High-precision, automated integration of multiple isothermal titration calorimetric thermograms: new features of NITPIC. **Methods**, v. 76, p. 87-98, Apr 2015.
- SCHNEIDER, J. Treatment of human African trypanosomiasis. **Bull World Health Organ**, v. 28, n. 5-6, p. 763-86, 1963.
- SOARES, A. M. et al. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 373, n. 1, p. 7-15, Jan 1 2000.
- SOARES, A. M. et al. Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 387, n. 2, p. 188-96, Mar 15 2001.
- SOARES, A. M. et al. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 378, n. 2, p. 201-9, Jun 15 2000.
- SOARES, A. M. et al. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, v. 36, n. 3, p. 503-14, Mar 1998.
- SOARES, A. M. et al. Alkylation of myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 2, p. 258-70, Feb 2004.
- SOARES, A. M. et al. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Curr Med Chem**, v. 12, n. 22, p. 2625-41, 2005.
- STABELI, R. G. et al. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 142, n. 3-4, p. 371-81, Mar-Apr 2006.
- TICLI, F. K. et al. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, v. 46, n. 3, p. 318-27, Sep 1 2005.
- VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. Molecular replacement with MOLREP. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 66, n. Pt 1, p. 22-5, Jan 2010. ISSN 1399-0047
- WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Eng**, v. 8, n. 2, p. 127-34, Feb 1995. ISSN 0269-2139
- WATANABE, L. et al. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A₂: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid. **Biochimie**, v. 87, n. 2, p. 161-7, Feb 2005. ISSN 0300-9084
- WILLIAMS, D. et al. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 89-91, Jan 2 2010.
- WILLIAMSON, J.; DESOWITZ, R. S. Prophylactic activity of suramin complexes in animal trypanosomiasis. **Nature**, v. 177, n. 4519, p. 1074-5, Jun 9 1956.
- WISEMAN, T. et al. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. **Anal Biochem**, v. 179, n. 1, p. 131-7, May 15 1989.
- ZHOU, X. et al. Structural characterization of myotoxic ecarpholin S from *Echis carinatus* venom. **Biophys J**, v. 95, n. 7, p. 3366-80, Oct 2008.